

UNIVERSITE DE NANCY I

THESE DE DOCTORAT D'ETAT EN PHARMACIE

RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

Yves LANDRY

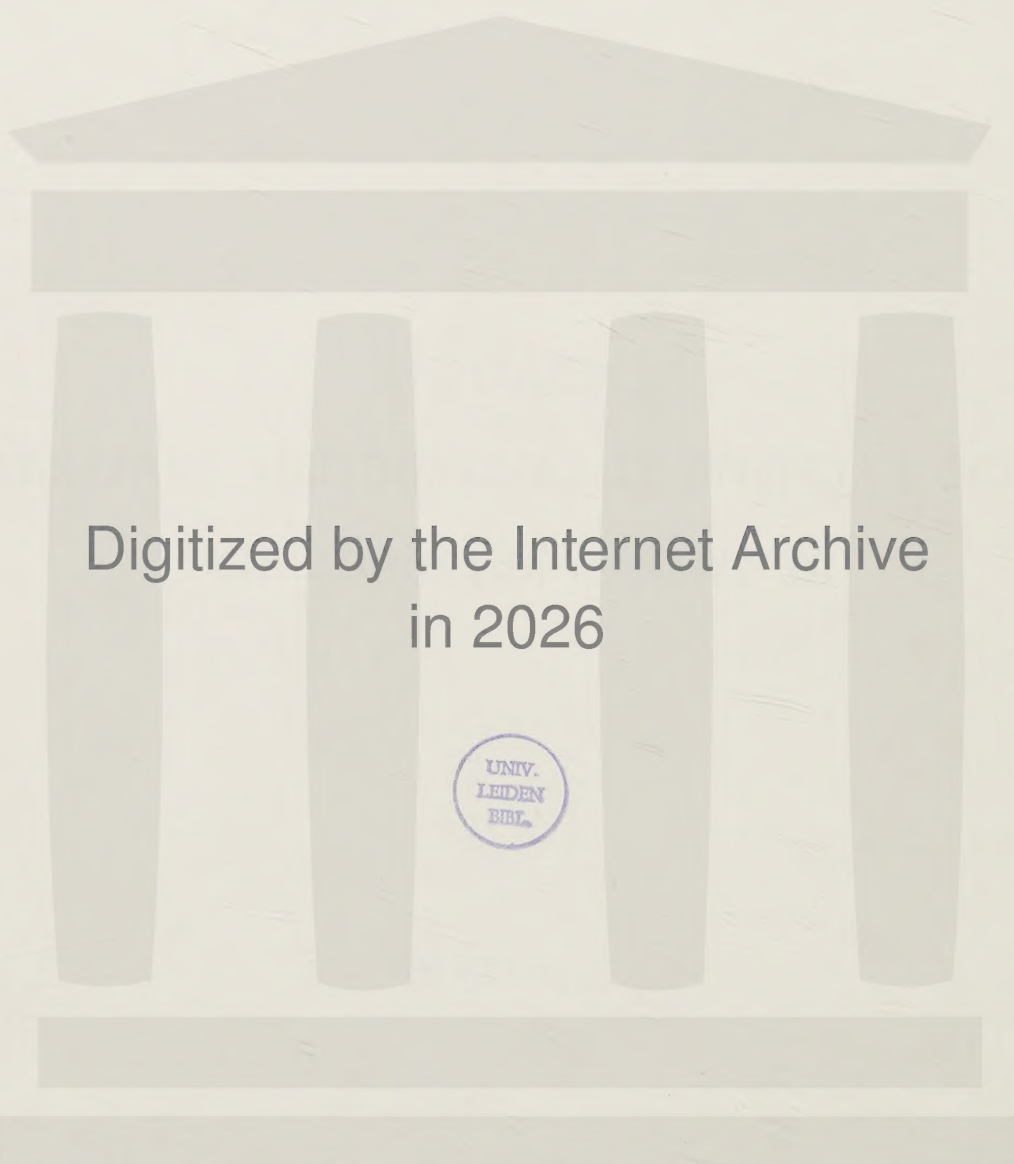
1973

TOME II

Figures et Tableaux

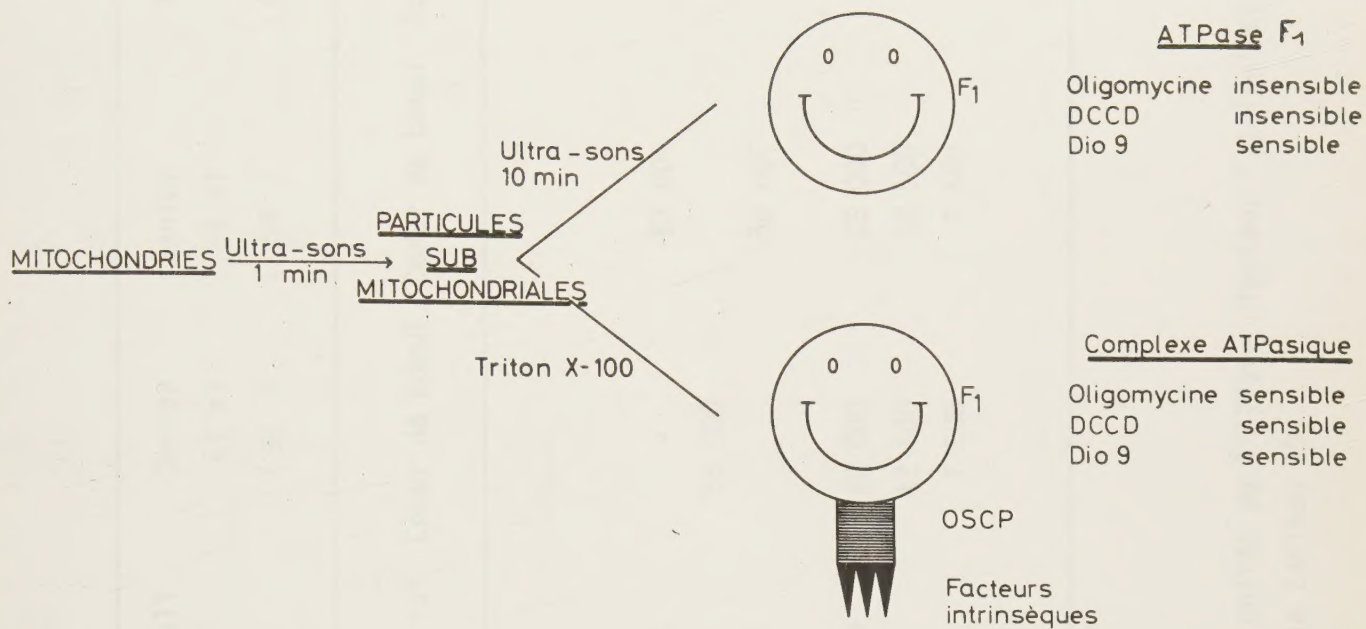
RELATIONS
ENTRE L'ACTIVITE ET LA STRUCTURE QUATERNAIRE
DE L'ATPase MITOCHONDRIALE

Yves LANDRY



Digitized by the Internet Archive
in 2026





Principes d'extraction de l'ATPase mitochondriale sous forme " F_1 " et "complexe ATPasique".

Tableau A.

Références	Tzagoloff et al (87)	Lambeth et al (41)	Catterall et al (15)	Senior et al (68)	Senior et al (69)	Knowles et al (39)
Matériel	<u>S.cerevisiae</u> Foie de rat Foie de rat Coeur de boeuf Coeur de boeuf Coeur de boeuf					
Sous unités						
A	58 500	-	62 500	-	53 000	59 500
B	54 000	53 000	57 000	55 000	50 000	54 000
	38 500					
C	31 000	28 000	36 000	25 000	25 000	33 000
D	12 000	12 500	-	12 500	12 500	13 600
E	-	8 500	-	7 500	7 500	-

Tableau B :

Comparaison des poids moléculaires des sous unités de l'ATPase (facteur F₁) isolées à partir de diverses espèces (voir également le tableau 19).

Etapes de purification	Protéines totales mg	Activité ATPasique totale $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{mn}^{-1}$	Rendements		Activité ATPasique spécifique $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	Facteur d'enrichissement en activité ATPasique
			% Protéines	% ATPase		
Homogénat	150	105	100	100	0,7	
Culot mitochondrial	40	64	27	61	1,6	x 2,3
P S M	5,5	33 à 55	4	31 à 52	6 à 10	x 8,5 à 14

Tableau 1 :

Préparation de particules submitochondriales (P S M) de Schizosaccharomyces pombe cultivé en milieu glycérol (voir les conditions expérimentales dans "matériel et méthodes").

Recouvrement	<u>Culot mitochondrial + surnageant</u>
	Homogénat
Protéines	98 à 103 %.
ATPase totale	96 à 99 %.
ATPase oligo.S.	92 à 95 %.

Tableau 2 :
Etude de recouvrement lors de la préparation du
culot mitochondrial:Homogénat=100.

Un homogénat de cellules cultivées en milieu glycérol est centrifugé 30 mn à 16 000g. Le culot mitochondrial et le surnageant sont séparés. Les protéines et les activités ATPasiques sont mesurées immédiatement.

	Activité spécifique relative %	Rendement d' extraction %	Recouvrement d'activités %
ATPase totale	90	40	75
ATPase oligo.S.	43	15	20

Tableau 3 :

Extraction du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine chez Schizosaccharomyces pombe cultivé sur glycérol selon Tzagoloff (87).

Les résultats sont exprimés par rapport à ceux des P S M fixés arbitrairement à 100. Conditions d'extraction:

- 5,5 mg de protéines (P S M).
- 0,2% Triton X-100.
- 4mM Tris-pH 6,8 (CH₃-COOH).
- Volume final 1,250. Température 4°C.

Après centrifugation pendant 20mn à 100 000g, le surnageant est séparé du culot. Le culot est remis en suspension. Les activités enzymatiques sont mesurées immédiatement.

	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>		<u>Schizosaccharomyces</u> <u>pombe</u>	
	Rendement d' extraction %	Recouvrement %	Rendement d' extraction %	Recouvrement %
Protéines totales	43	103	45	102
ATPase totale	70	85	40	75
ATPase oligo.S.	73	88	15	20

Tableau 4 :
 Comparaison de l'extraction, selon Tzagoloff, de l'ATPase par
 le Triton X-100 chez Schizosaccharomyces pombe et Saccharomyces cerevi-
siae .

Conditions identiques à celles du tableau 3 .

Temps de contact	Rendement d'extraction		
	Protéines	ATPase totale	ATPase oligo.S.
0'	45	62	20
15'	45,3	55	19
60'	46,6	54	16

Tableau 5 :
Influence du temps de contact en présence de 0,2%
de Triton X-100 sur la solubilisation des protéines totales
et de l'ATPase des P S M (100) de Schizosaccharomyces pombe,
cultivée en milieu glycérol.

Conditions identiques à celles du tableau: 3.

Milieux d'extraction	Activités spécifiques de l'extrait		Rendements d'extraction			Recouvrements	
	ATPase totale	ATPase oligo.S.	Protéines	ATPase totale	ATPase oligo.S.	ATPase totale	ATPase oligo.S.
TRIS - CH ₃ COOH	2,7	1,6	52	27	17	58	37
+ ATP	4,5	2,7	52	45	29	97	68
+ EDTA	3,3	1,5	52	33	16	67	35
+ ATP + EDTA	5,0	3,4	52	50	37	97	71

Tableau 6 :

Influence de la présence d'ATP et d'EDTA sur l'extraction de l'ATPase par le Triton X-100 à partir des P S M de Schizosaccharomyces pombe cultivé en milieu glycérol.

Conditions: - 5 mg de protéines P S M (Activité ATPasique spécifique 4,8)
- 35 mM Tris- CH₃ COOH (pH 8,3)
- 2 mM ATP
- 1 mM EDTA
- 0,2% Triton
Volume final: 1250 µl.

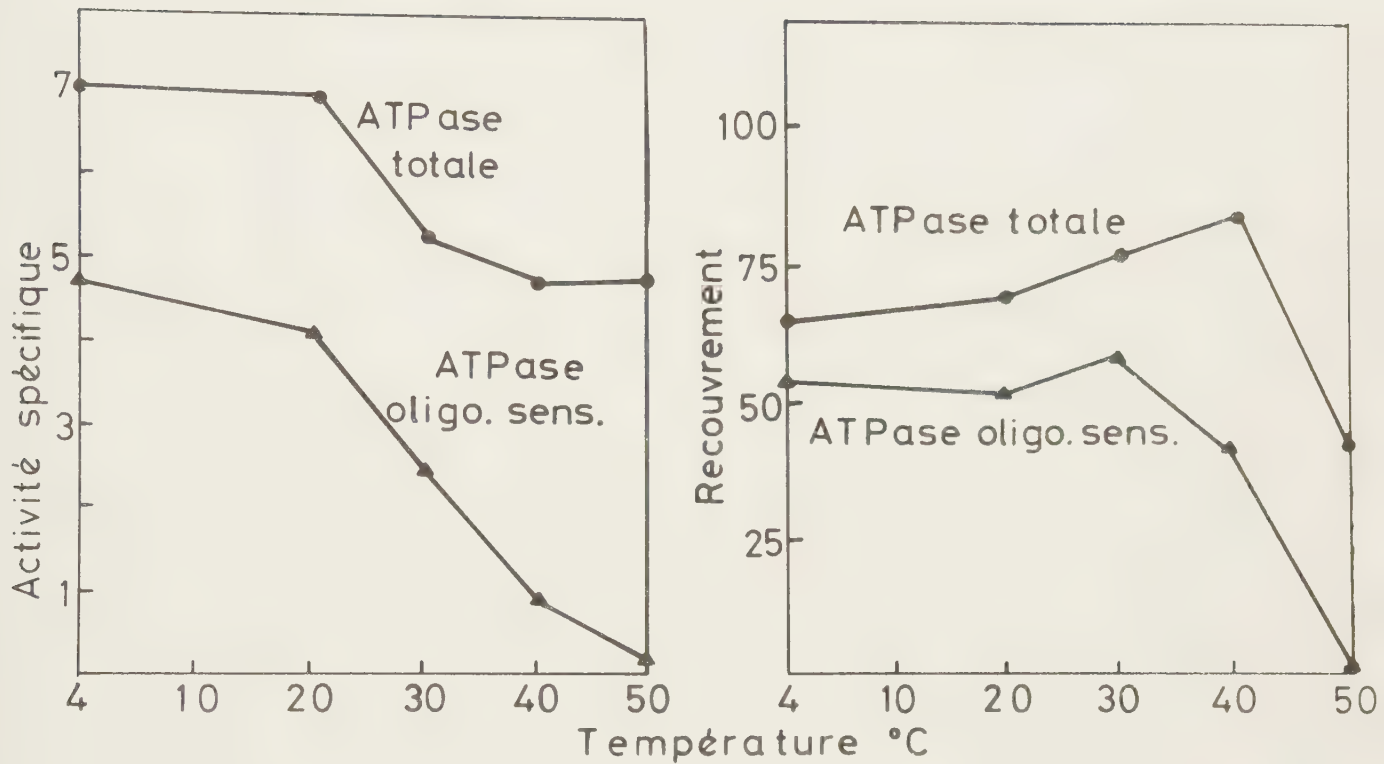


Figure 1:

Influence de la température sur la solubilisation par le Triton X-100, des protéines totales et de l'ATPase, des PSM de S.pombe cultivé en milieu glycérol.

Conditions: les PSM (4mg de protéines par ml) sont incubées en présence de 0,2% de Triton X-100 (4mM Tris, pH 6,8) pendant 15 mn aux températures indiquées. Les différents échantillons sont centrifugés 20 mn à +4°C. Les activités enzymatiques des culots et des surnageants sont mesurées immédiatement. Le graphique de gauche exprime l'activité spécifique de l'ATPase extraite par le Triton X-100. Le graphique de droite est obtenu par comparaison de l'activité des PSM (=100) et celles additionnées du surnageant et du culot, obtenus après incubation avec le Triton X-100 ("Recouvrement").

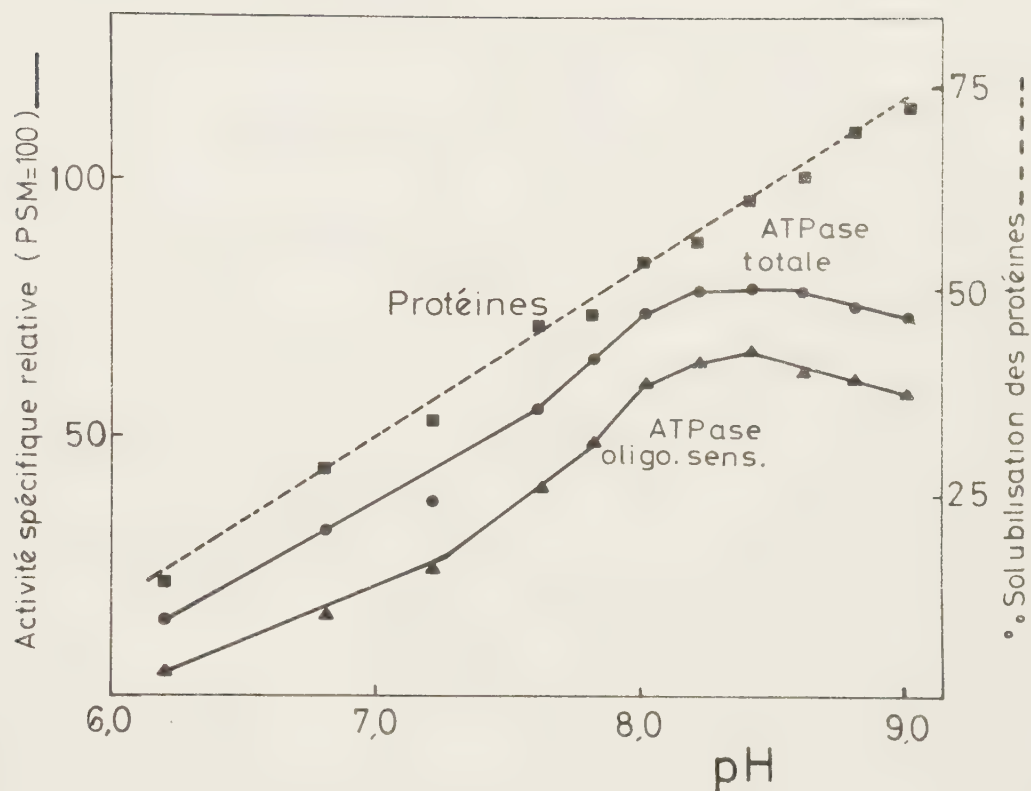


Figure 2:

Influence du pH sur la solubilisation par le Triton X-100, des protéines totales et de l'ATPase des PSM de S.pombe cultivée en milieu glycérol.
Conditions:

0,2% Triton X-100, 4 mM Tris, 2 mM ATP, 1 mM EDTA. Les pH inférieurs à 8,8 sont obtenus en présence d'acide acétique; les pH supérieurs à 8,8 en présence de soude (4 mg protéines PSM par ml, activité spécifique =4).

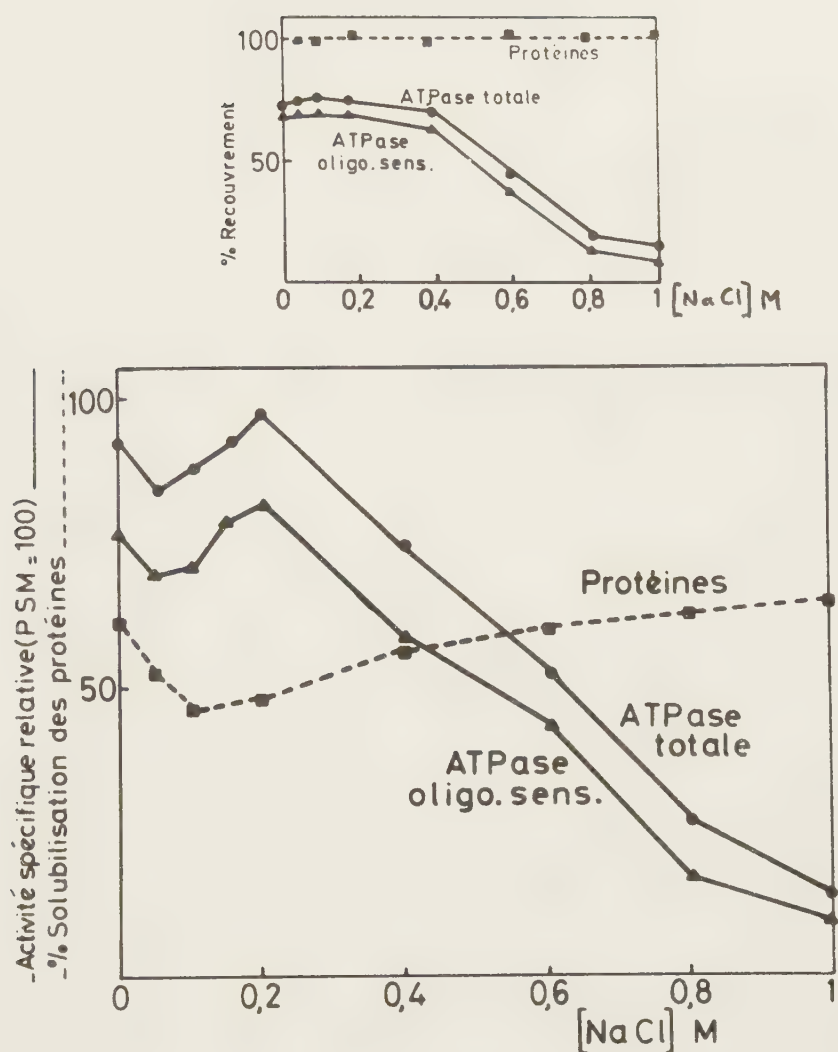


Figure 3 :

Influence de la concentration en NaCl sur la solubilisation par le Triton X-100 des PSM de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

0,2% Triton X-100, 4 mM Tris-Acide acétique pH 6,8, 4 mg protéines PSM par ml (activité spécifique = 4).

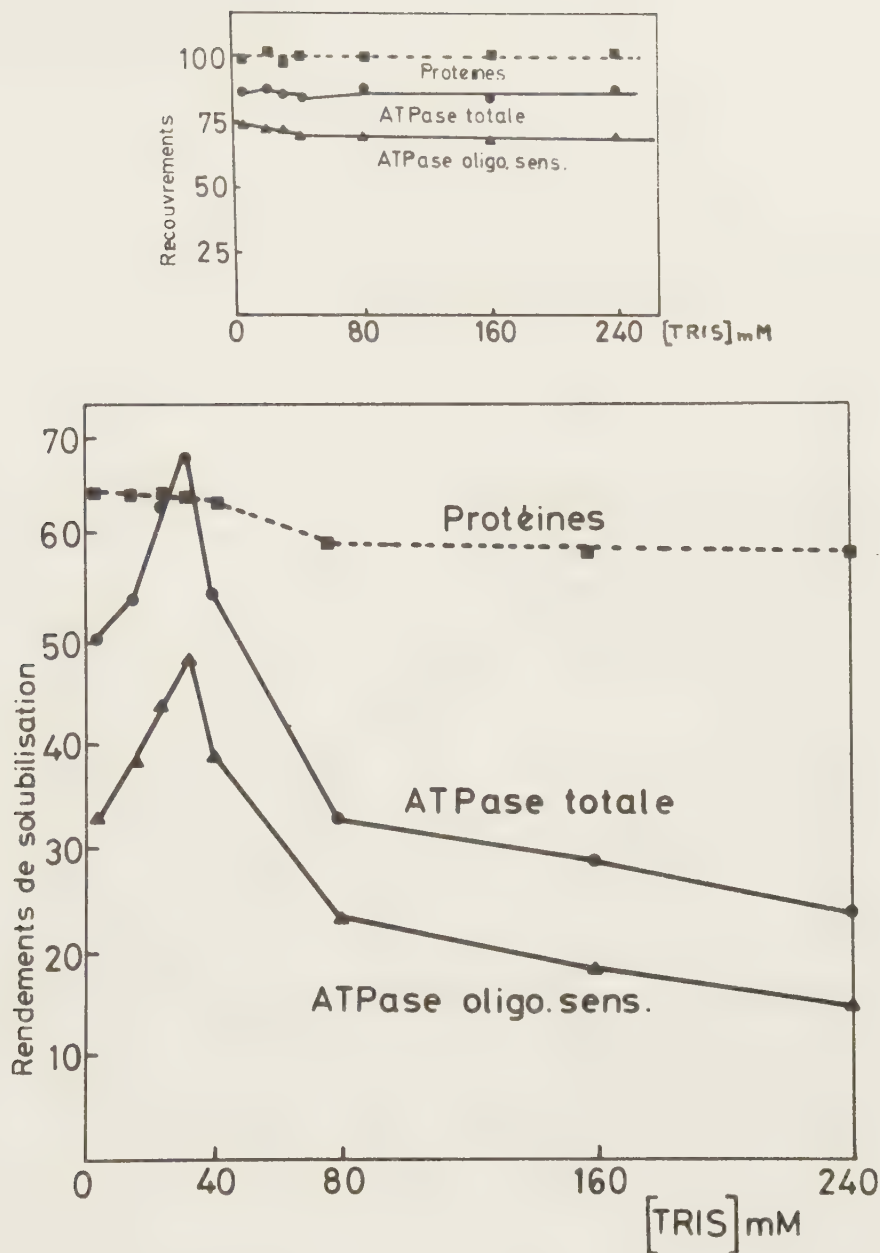


Figure 4 :

Influence de la concentration en Tris sur la solubilisation par le Triton X-100 des PSM de S.pombe cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

Identiques à "matériel et méthodes" excepté pour les concentrations en Tris

Le pH est maintenu à 8,3 par CH_3COOH .

4 mg protéines par ml.

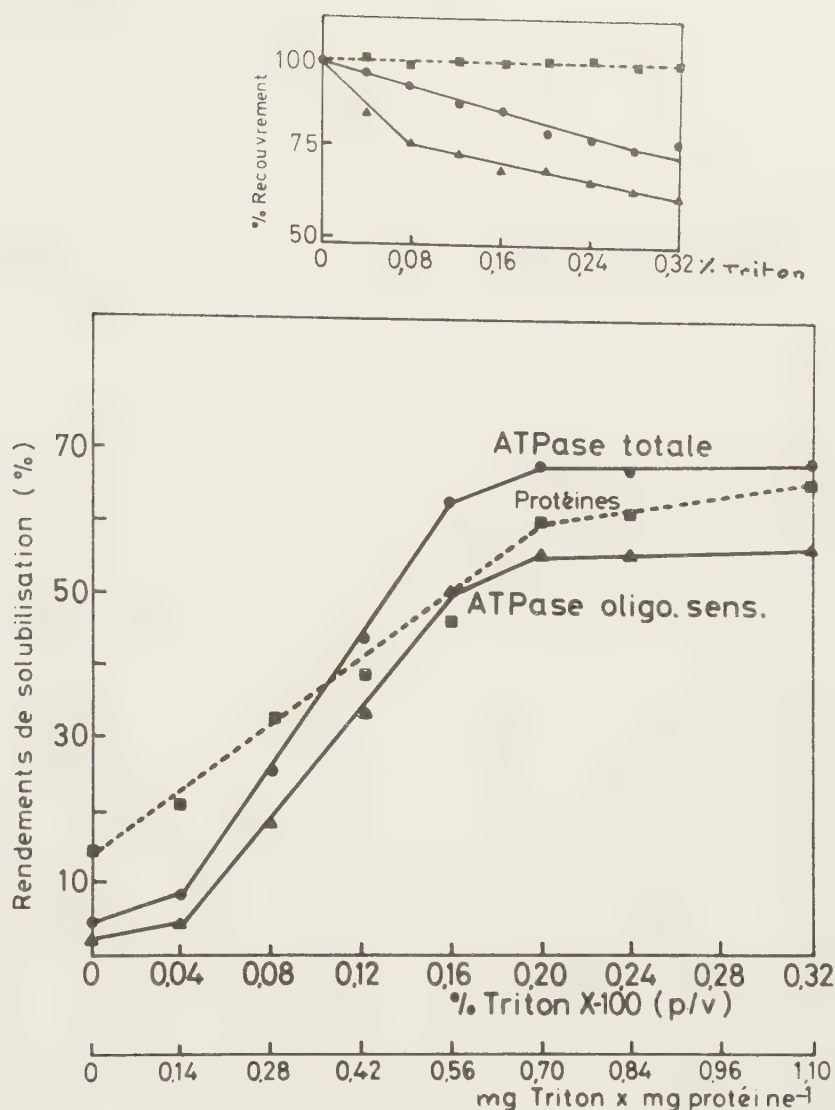


Figure 5 :

Influence de la concentration en Triton X-100 sur la solubilisation des PSM de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

Identiques à "matériel et méthodes" excepté pour les concentrations en Triton. La quantité de protéine de PSM est identique pour chaque essais. Seules varient les concentrations de Triton, exprimées en % dans le milieu (poids/volume), et en mg par mg de protéines PSM.

Protéines P S M dans l'essai (mg)	4,6	2,3	1,15	0,77
mg Triton par mg protéines	0,27	0,54	1,09	1,63
Rendements de solubilisation %				
- Protéines	29,9	49,9	66,3	85,5
- ATPase totale	19,6	39,4	57,6	60,9
- ATPase oligo.S.	14,7	31,2	49,4	47,8

Tableau 7 :

Influence du rapport Triton/Protéine, lors de la solubilisation des P S M de Schizosaccharomyces pombe cultivé en milieu glycérol.

Conditions:- 35mM Tris-CH₃ COOH pH 8,3

- 2mM ATP

- 1mM EDTA

- 1,25 mg Triton

-Volume final:1250 μ l

Les quantités de protéine dans l'essai sont indiquées pour chaque cas.

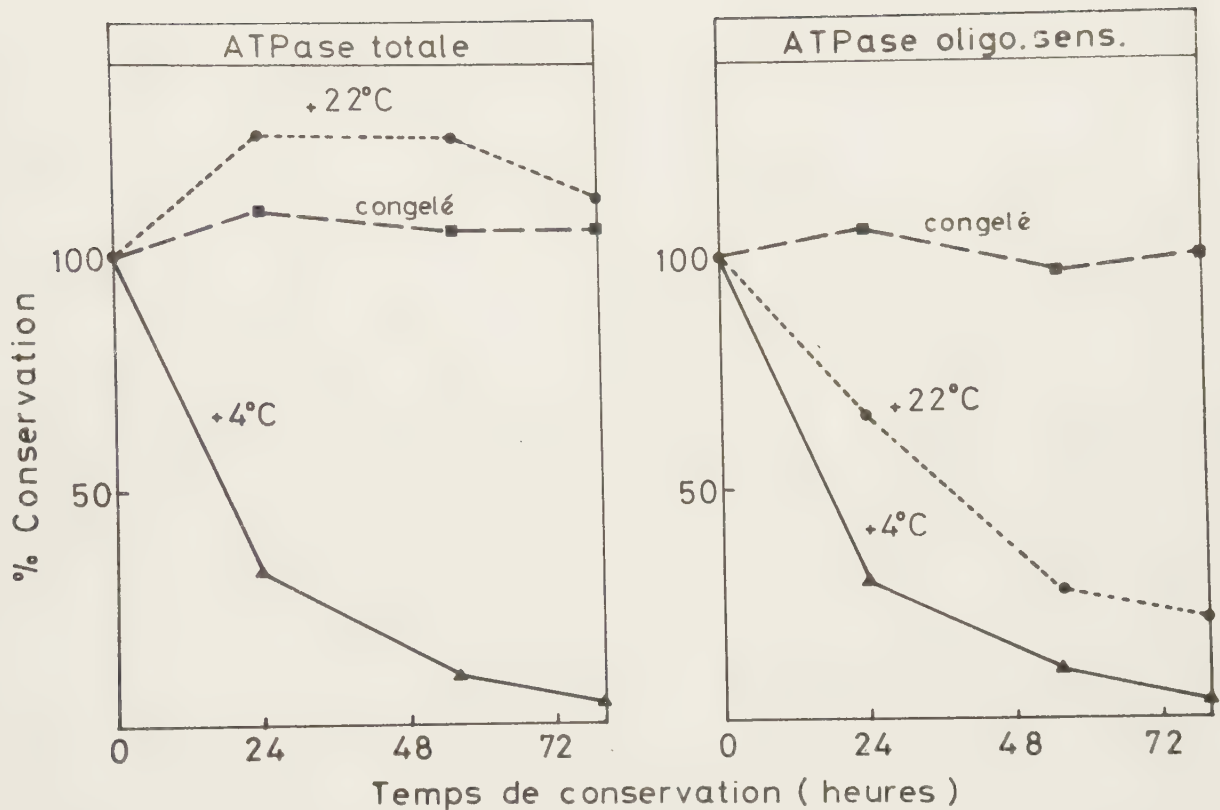


Figure 6 :

Conservation selon la température et le temps, de l'extrait par le Triton X-100 des PSM de S.pombe cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

Les conditions de préparation sont identiques à "matériel et méthodes".

Conditions de conservation	% ATPase totale		% ATPase oligo.S.	
	Températures de conservation + 22°C + 4°C		Températures de conservation + 22°C + 4°C	
<u>après 12 h</u>				
M.E.	105	48	42	36
M.E. + 10% Glycérol	90	82	46	43
M.E. + 10% Saccharose	93	56	44	40
<u>après 24 h</u>				
M.E.	102	30	25	24
M.E. + 10% Glycérol	93	73	31	42
M.E. + 10% Saccharose	81	34	22	21

Tableau 8 :

Conservation de l'extrait au Triton X-100 des P S M de Schizosaccharomyces pombe cultivé sur glycérol selon le milieu et la température.

Conditions:

Une partie de l'extrait est conservée à + 22°C ou + 4°C avec ou sans adjonction de saccharose ou glycérol au milieu "M.E": 35 mM Tris-CH₃COOH pH 8,3 2 mM ATP, 1 mM EDTA.

Les valeurs sont exprimées en % des activités mesurées immédiatement après la préparation.

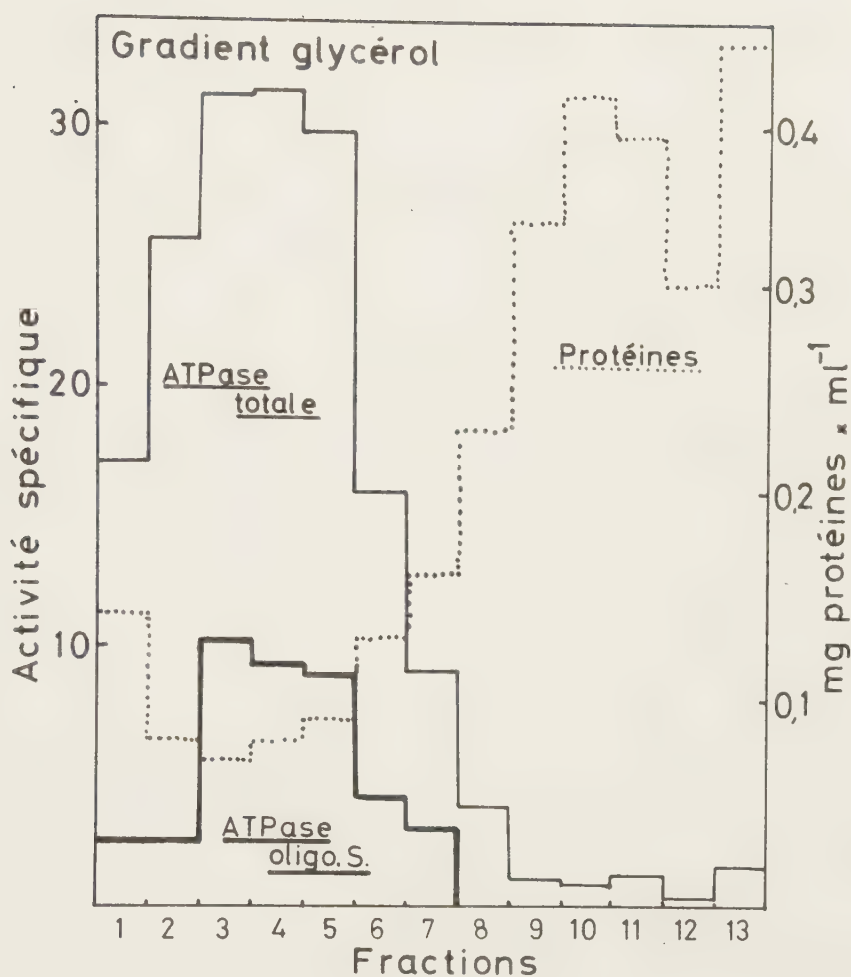


Figure 7 :

Purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine de S.pombe cultivée en milieu glycérol, par centrifugation dans un gradient linéaire de glycérol.

Dépot au sommet: extraits des PSM par le Triton X-100 contenant 30 mg de protéines d'activités spécifiques.

ATPase totale: 11,8, ATPase sensible à l'oligomycine: 10, gradient linéaire de glycérol 5 à 20% dans un tube de 12 ml.

Centrifugation 3 heures à 150 000 g, à +4°C.

Fractions numérotées à partir du fond du tube.

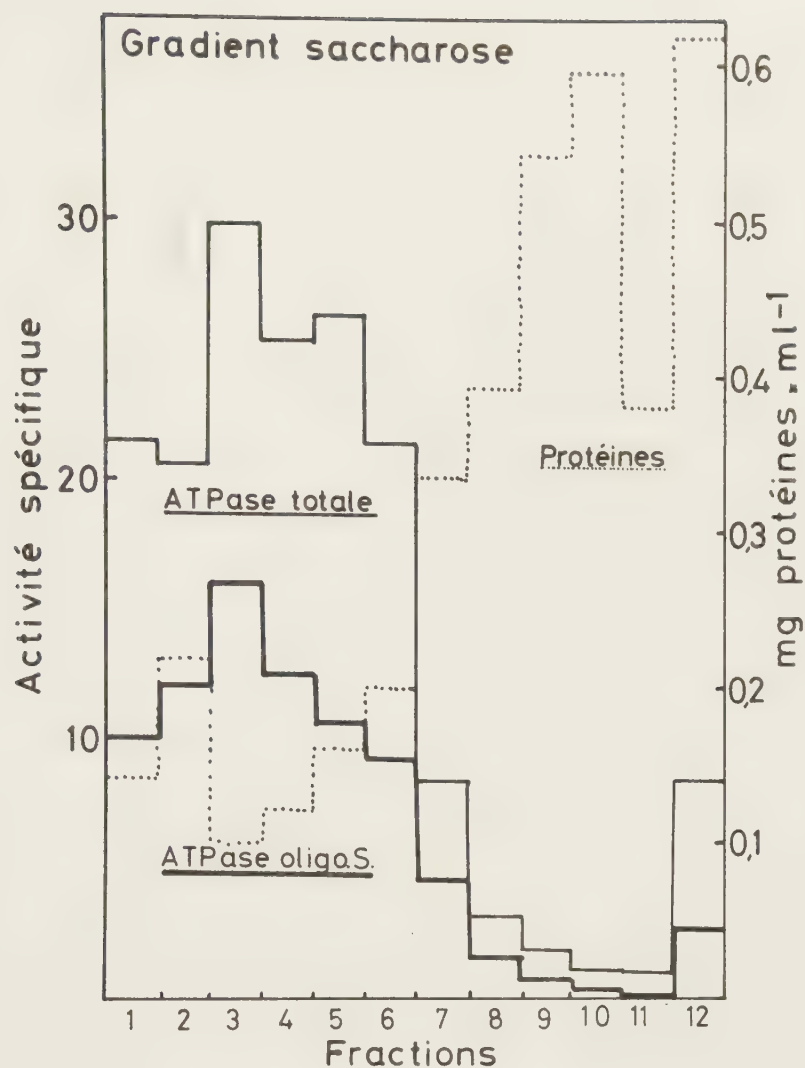


Figure 8 :
 Purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine sur un gradient linéaire de saccharose 5 à 20%.
 Conditions:
 Identiques à celles de la figure 7.

Milieux de conservation	$\frac{\text{ATPase oligo.S.}}{\text{ATPase totale}} \times 100$	
	Températures de conservation	
	+ 22°C	+ 4°C
M.E.	29,5	53
M.E. + 10% Saccharose	34	51
M.E. + 10% Glycérol	36	37

Tableau 9 :

Rapport des activités ATPasiques sensibles à l'oligomycine et totales, d'un extrait par le Triton X-100 des P.S.M. de Schizosaccharomyces pombe cultivé en milieu glycérol, après 12 heures de conservation à + 22 et + 4°C, en présence ou non de saccharose ou de glycérol.

Conditions identiques à celles du tableau 8 .

Etapas de purification	Protéines totales mg	Activités totales $\mu\text{moles Pi.mn}^{-1}$		Activités spécifiques $\mu\text{moles Pi.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	
		ATPase totale	ATPase oligo.S.	ATPase totale	ATPase oligo.S.
Homogénat	150,0	105,0	60,0	0,7	0,4
P S M	5,5	56,0	47,0	10,0	8,6
Extrait au Triton	2,4	28,0	24,0	11,8	10,0
Gradient Saccharose	0,1	3,0	1,6	30,0	16,0

Tableau 10 :

Purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine chez Schizosaccharomyces pombe cultivé sur glycérol.

Conditions: voir "matériel et méthodes".

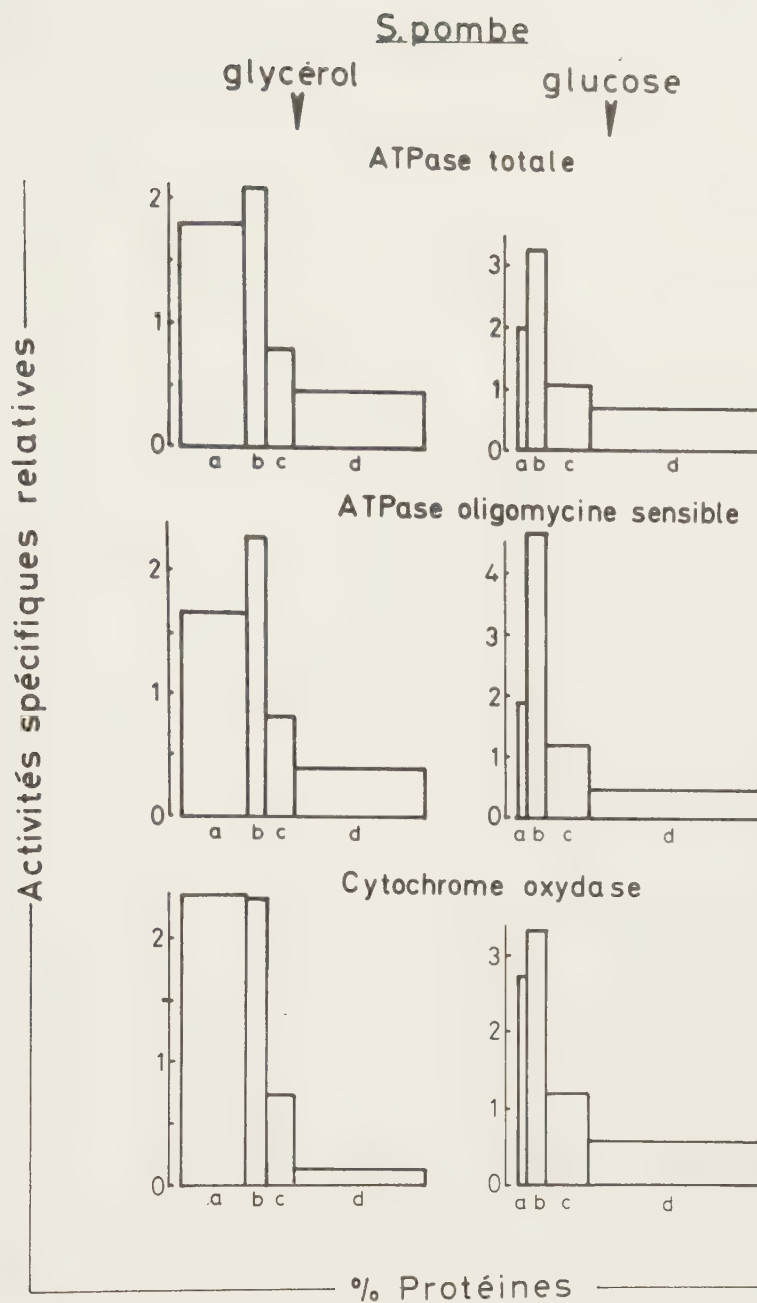


Figure 9 :

Centrifugation différentielle des homogénats de S. pombe cultivée en milieu glucose. Les homogénats sont préparés comme dans "matériel et méthodes".

- Fractions: a : culot après centrifugation 10 mn à 10 000 g.
- b : culot suivant après centrifugation 10 mn à 30 000 g.
- c : culot suivant après centrifugation 60 mn à 100 000 g.
- d : surnageant final. .../...

(Suite légende figure 9).

- Représentation graphique:

- abscisse: protéines de chaque fraction exprimées en % des protéines de l'homogénat.
- ordonnée: activités spécifiques relatives (% de l' l'activité enzymatique totale de chaque fraction par rapport à l'activité de l'homogénat/ % des protéines).

Cette représentation permet d'assimiler la surface de chaque fraction au pourcentage d'activité enzymatique par rapport à l'homogénat.

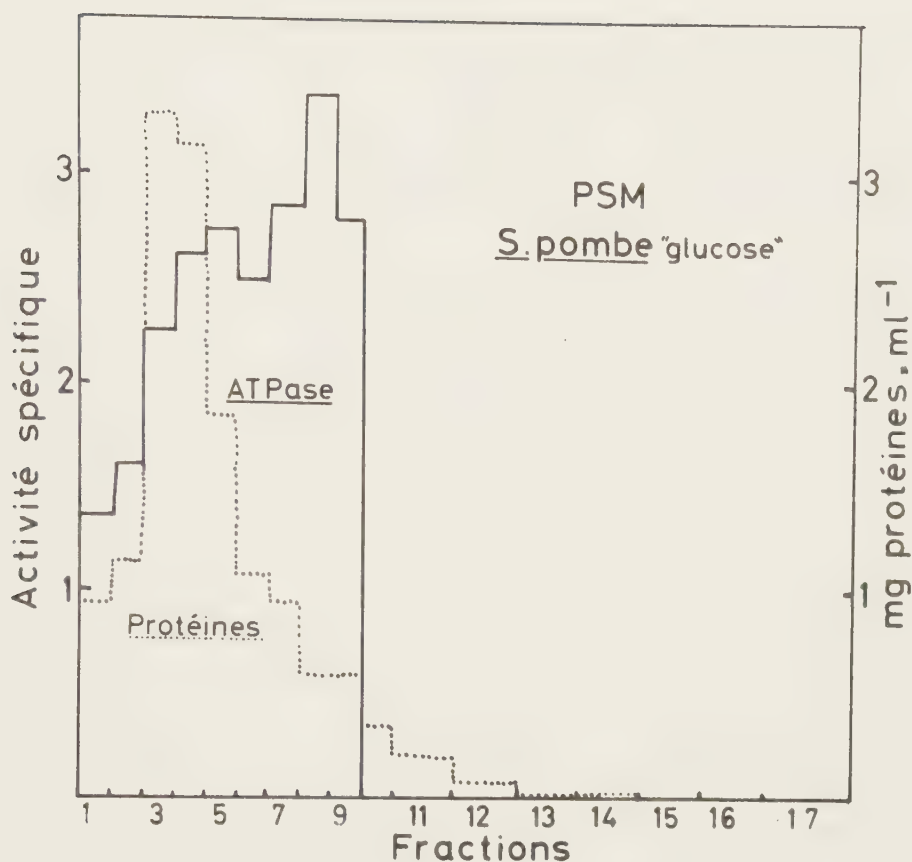


Figure 10 :

Purification sur gradient de saccharose de particules submitochondriales isolées de *S. pombe* cultivé en milieu glucose.

Conditions:

Gradient linéaire de saccharose 24 à 54 %, 50 mM Tris pH 7,5: 15 ml (tube de 17 cm cube "Long" rotor Beckman S W 27).

Dépot: 500 μ l de PSM (soit 11 mg de protéines d'activité ATPasique spécifique = 2,32).

Centrifugation à 15 000 RPM pendant 15 heures.

Fractions numérotées à partir du fond du tube.

Souches	Phases de croissance					
	Exponentielle		Stationnaire débutante		Stationnaire prolongée	
	QO ₂	QCO ₂	QO ₂	QCO ₂	QO ₂	QCO ₂
S. pombe 972h ⁻ "glycérol"	50	140	63	149	70	140
S. pombe 972h ⁻ "glucose"	22	172	28	183	40	205
M 126 "glucose"	0	209	0	296	0	216

Tableau 11 :

Comparaison de l'absorption d'oxygène et de rejet de CO₂ chez Schizosaccharomyces pombe, souche sauvage cultivée en milieu glycérol et milieu glucose;et chez le mutant M 126, selon la phase de croissance.

Conditions:
Culture: Yeast extract (Difco) 2%, Bacto peptone (Difco) 2%, Glycérol 3,6% (ou glucose 5,8%), pH 4,5.
Volume de 200 ml dans un flacon de 2 litres. Agiter à 180 rotations par minutes.

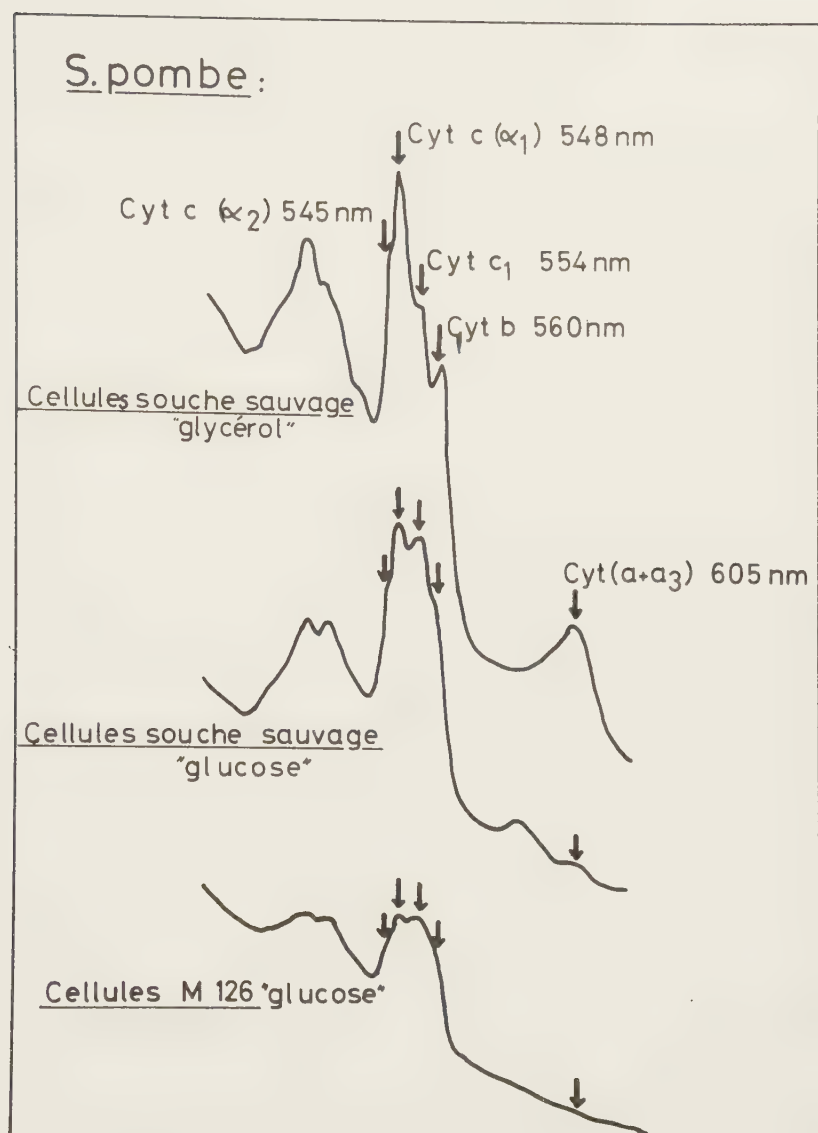


Figure 11 :

Spectres d'absorption des cytochromes des cellules de S.pombe cultivée en milieu glycérol et glucose (souche sauvage) et du mutant M 126.

Conditions:

Identiques à celles de "matériel et méthodes".

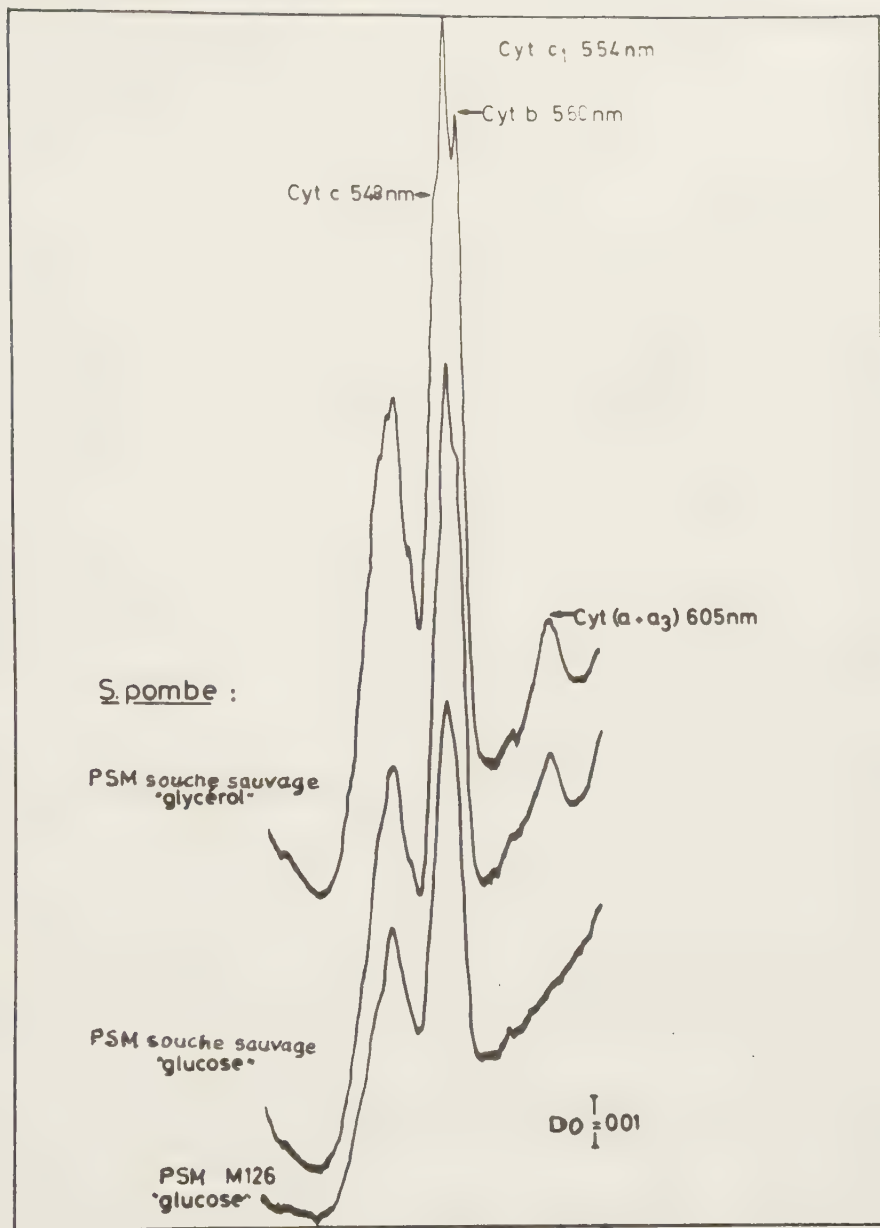


Figure 12 :
 Spectres d'absorption des cytochromes des particules submitochondriales de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol et milieu glucose (souche sauvage) et du mutant M 126.
 Conditions:
 Identiques à "matériel et méthodes".

Activités Spécifiques	<u>S.pombe</u> "glycérol"	<u>S.pombe</u> "glucose"	M.126 "glucose"
ATPase totale	0,8	0,4	0,2
ATPase oligo.S.	0,5	0,25	0

Tableau 12 :

Comparaison de l'activité ATPasique des homogénats de S.pombe cultivée en milieu glycérol et en milieu glucose et du mutant M.126.

Conditions: Les homogénats sont préparés selon les conditions exposées dans "matériel et méthodes"

Les activités ATPasiques sont mesurées en absence ("ATPase totale") et en présence d'oligomycine.

L'activité ATPasique sensible à l'oligomycine ("ATPase oligo .S."). est obtenue par différence de ces deux mesures. Les résultats sont exprimés en activités spécifiques ($\mu\text{moles Pi.mn}^{-1} \text{ mg protéines}^{-1}$).

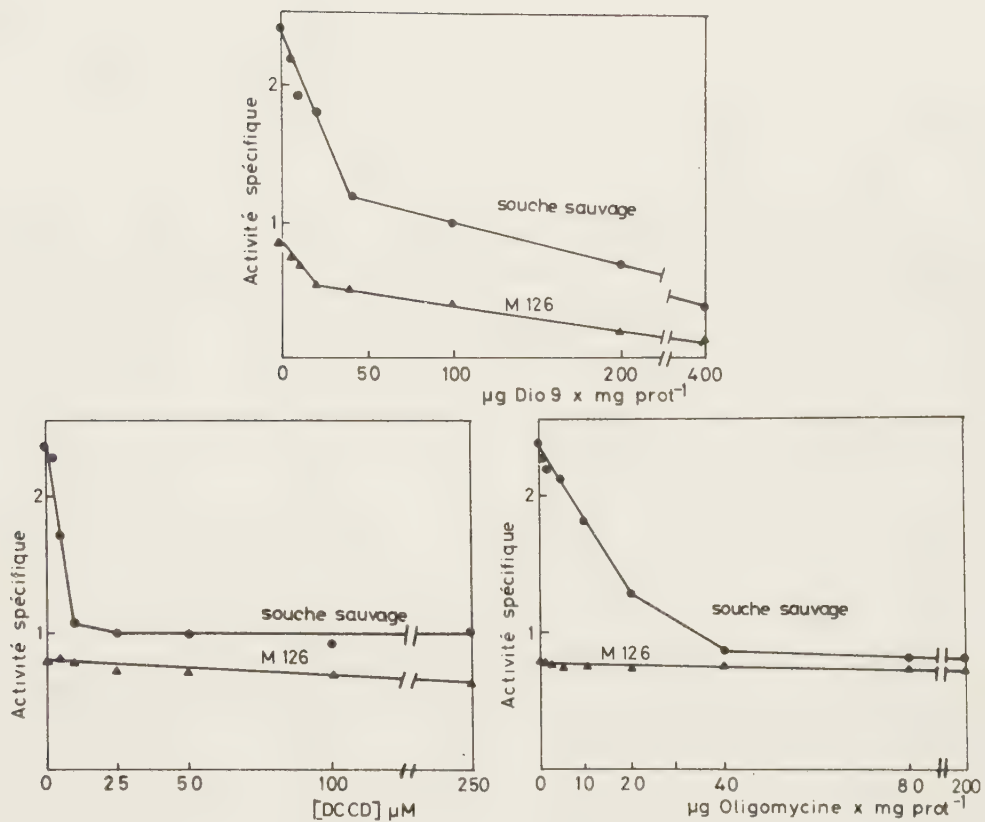


Figure 13 :

Effets du Dio 9, du DCCD et de l'oligomycine sur l'activité ATPasique des particules submitochondriales de S.pombe cultivée en milieu glucose: souche sauvage et mutant M 126.

Etapas de purification	Protéines totales mg	Activités totales $\mu\text{moles Pi. mn}^{-1}$		Activités spécifiques $\mu\text{moles Pi.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$	
		ATPase totale	ATPase oligo.S.	ATPase totale	ATPase oligo.S.
Homogénat	150	45,0	30,0	0,3	0,2
P S M	6,0	18,0	12,6	3,0	2,1
Extrait au Triton	2,5	5,5	3,2	2,2	1,3
Gradient Saccharose	0,1	0,6	0,4	6,3	3,5

Tableau 13 :
 Purification du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine chez
Schizosaccharomyces pombe cultivé sur glucose

Conditions: voir "matériel et méthodes".

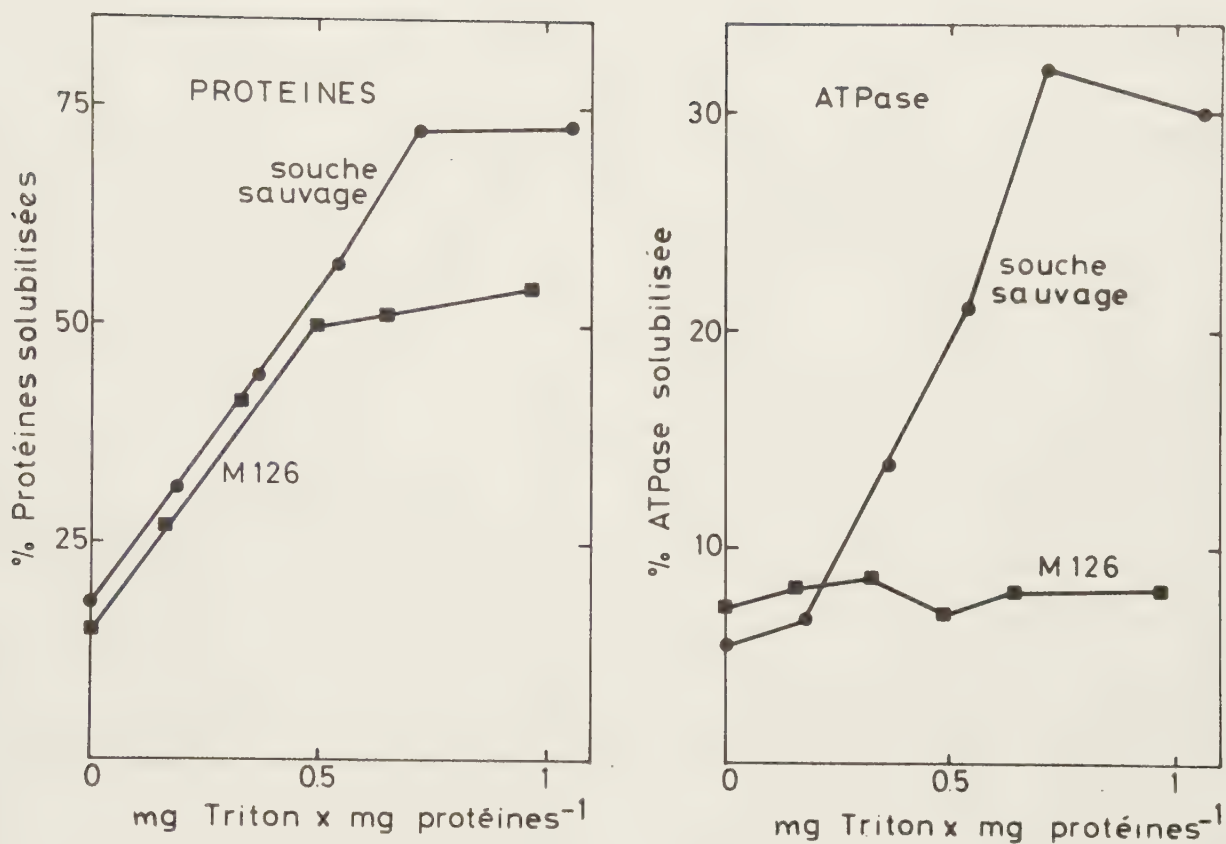


Figure 14 :

Influence de la concentration relative de Triton X-100 sur la solubilisation des protéines et de l'ATPase des particules submitochondriales de *S.pombe* cultivée en milieu glucose: souche sauvage et mutant M 126.

Conditions:

Activités spécifiques ATPasiques:

-PSM souche sauvage: 4,05

-PSM mutant M 126 : 1,35

Milieu: Tris 35 mM CH₃ COOH pH 8,3, 2 mM ATP, 1 mM EDTA.

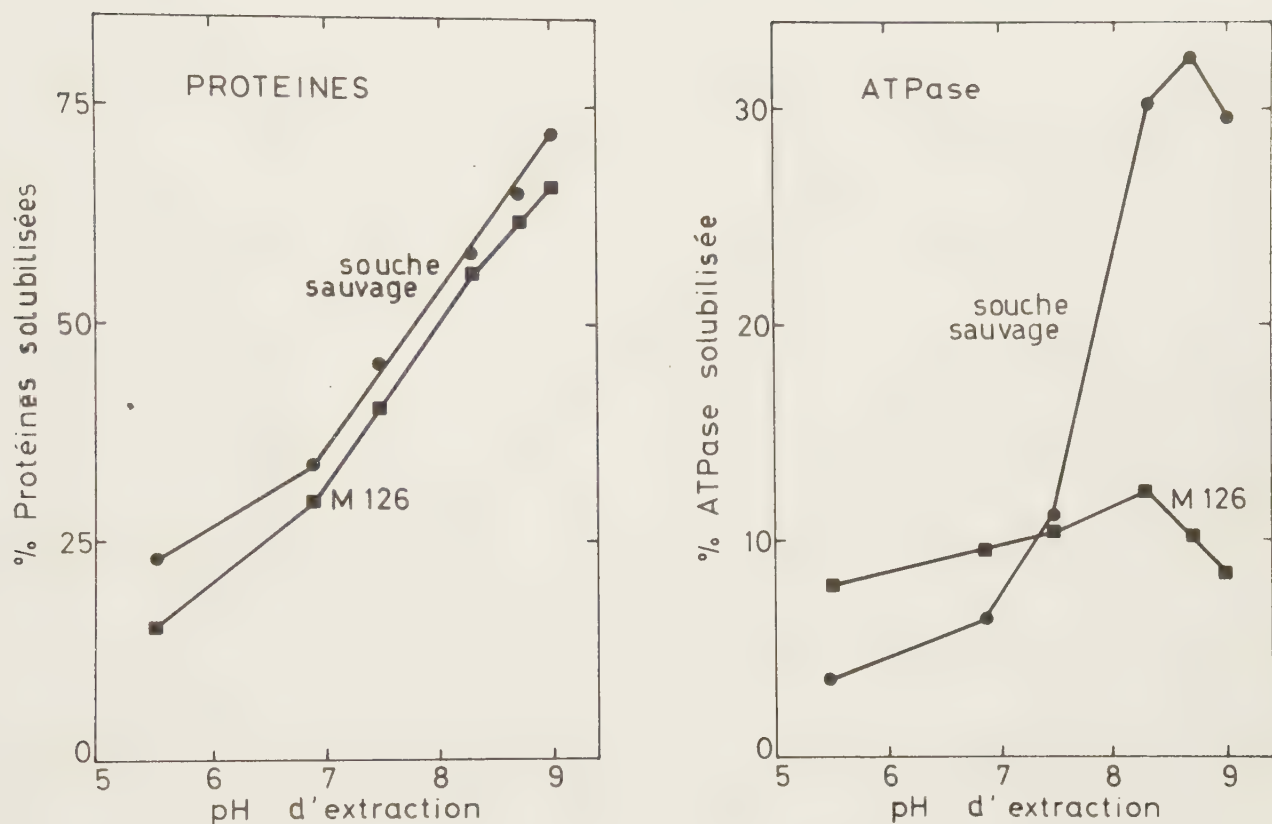


Figure 15 :

Influence du pH sur la solubilisation par le Triton X-100 des protéines et de l'ATPase des particules submitochondriales de S.pombe cultivée en milieu glucose : souche sauvage et mutant M 126.

Conditions:

Activités spécifiques ATPasiques: PSM souche sauvage 4,05; PSM mutant M 126 1,35.

Milieu: Tris 35 mM-CH₃ COOH (ou Na OH) pH indiqués; 2 mM ATP; 1 mM EDTA;

Triton X-100: souche sauvage 0,71 mg/mg protéines

mutant M 126 0,67 mg/mg protéines.

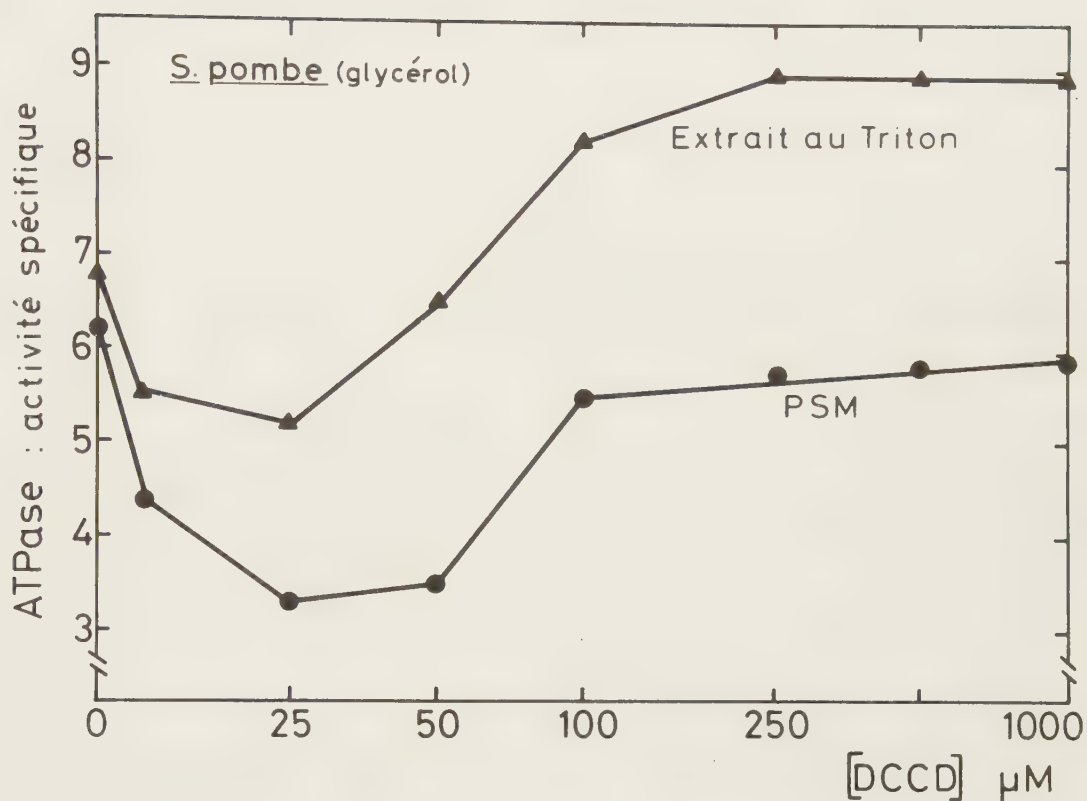


Figure 16 :

Effets du DCCD sur l'activité ATPasique de particules submitochondriales et l'extrait au Triton de S.pombe cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

20 μg (PSM) ou 15 μg (extrait au Triton) de protéines par ml de milieu de mesure de l'activité ATPasique.

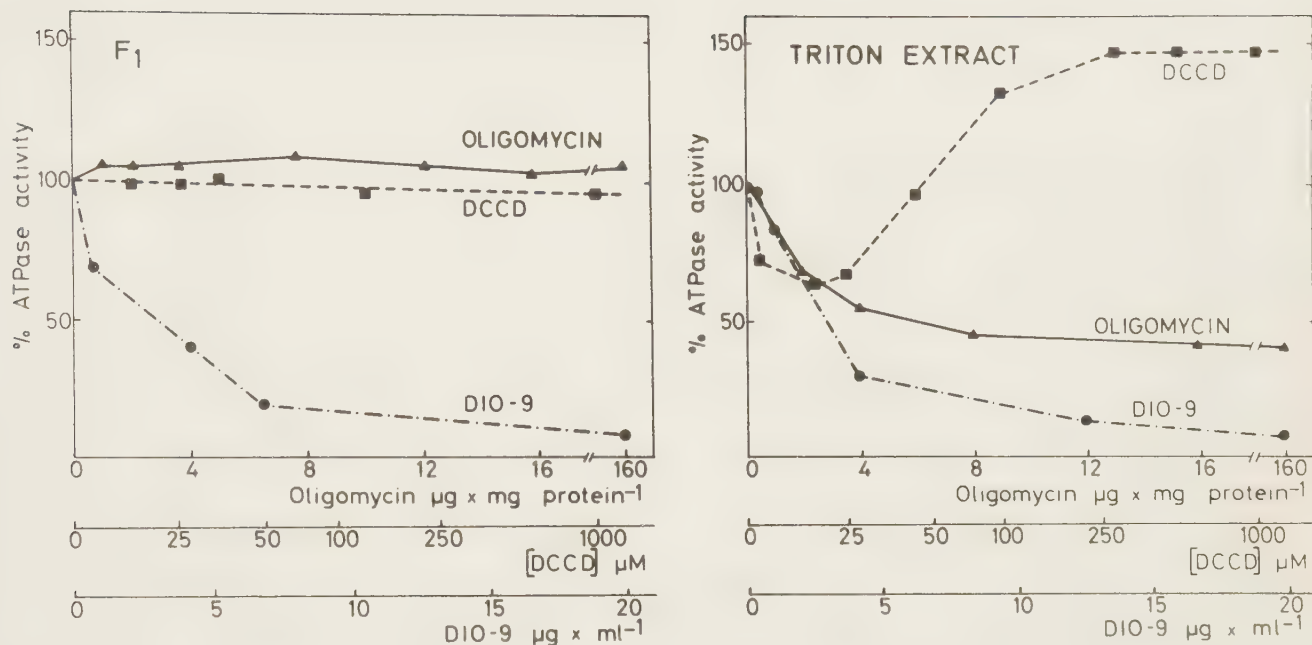


Figure 17 :

Effets du DCCD, de l'oligomycine et du Dio 9 sur l'activité ATPasique du facteur F₁ et de l'extrait au Triton de S.pombe cultivée en milieu glycérol. Conditions:

1 μg de protéine (activité spécifique = 60)

Extrait au Triton: 15 μg de protéines (activité spécifique= 6) par ml de milieu de mesure de l'activité ATPasique.

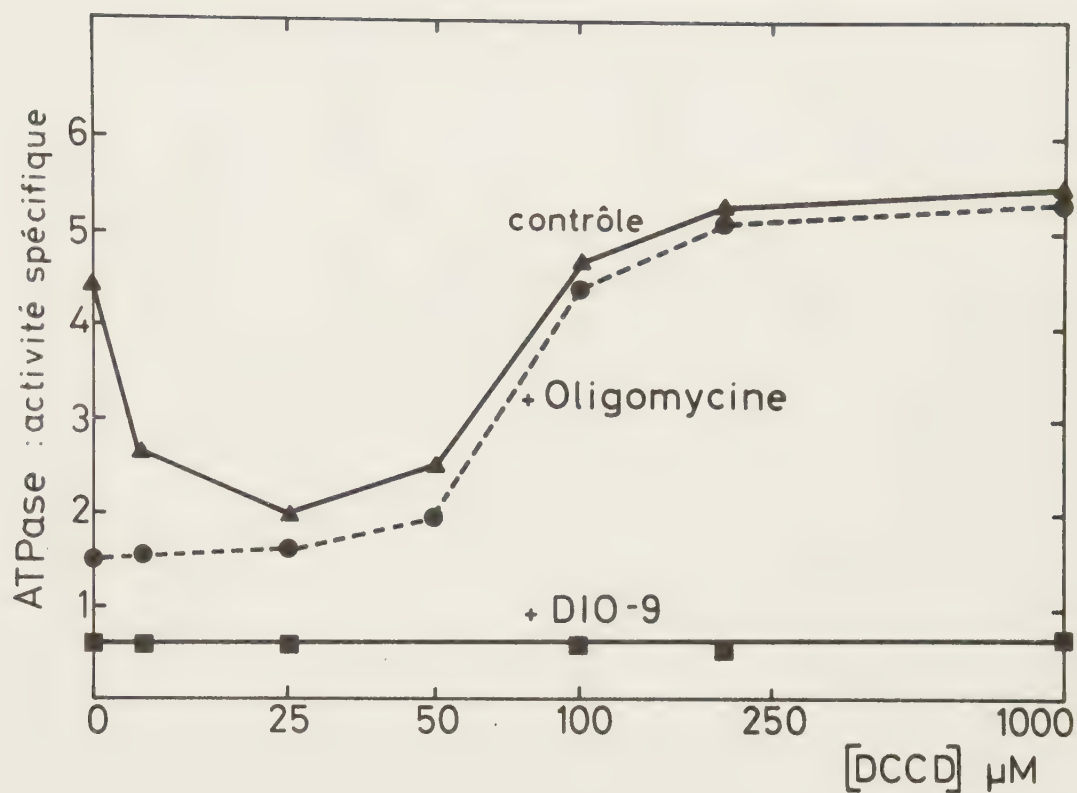


Figure 18 :

Effets du DCCD sur l'activité ATPasique de l'extrait au Triton de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol: essais en absence ("contrôle") et en présence d'oligomycine (80 μg par ml) ou de Dio 9 (20 μg par ml).

Conditions:

15 μg de protéines d'extrait au Triton par ml de milieu de mesure de l'activité ATPasique.

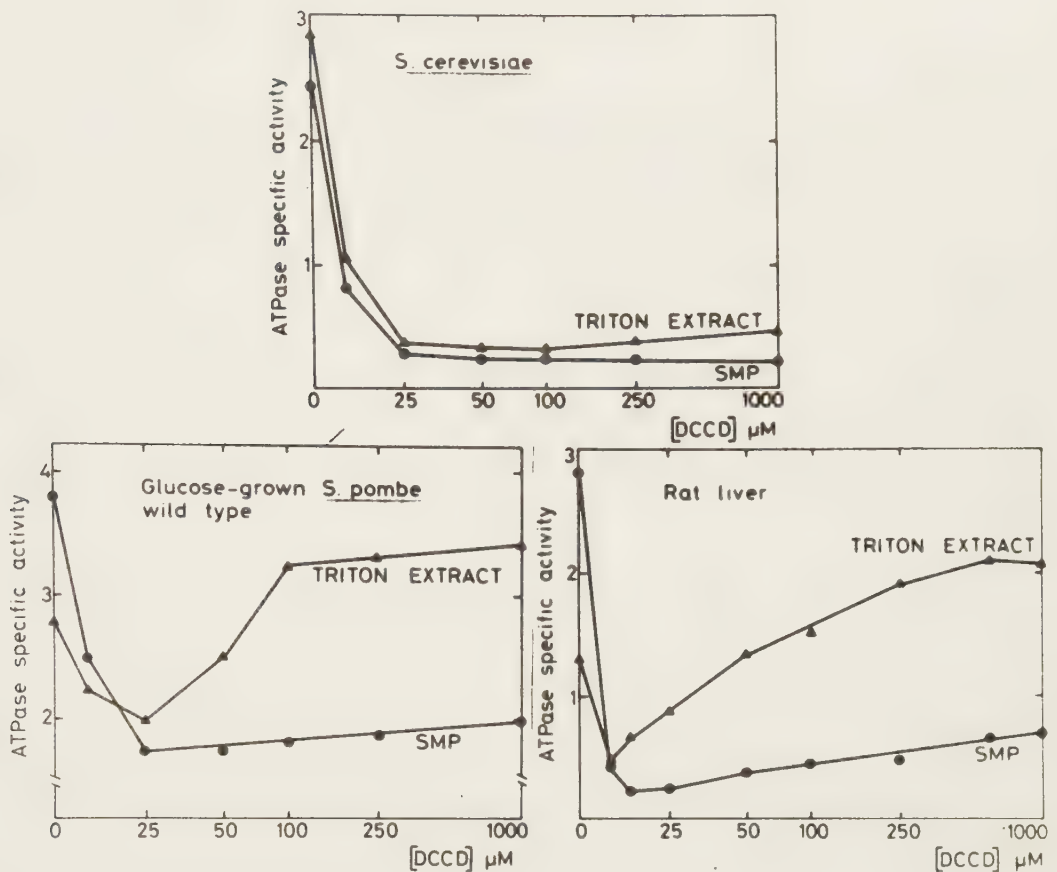


Figure 19 :

Effets du DCCD sur l'activité ATPasique des particules submitochondriales et de l'extrait au Triton de *S.cerevisiae* cultivée en milieu éthanol, *S.pombe* cultivée en milieu glucose et du foie de rat.

Conditions:

Quantités de protéines par ml de milieu de dosage de l'activité ATPasique:

- *S.cerevisiae*: PSM (30 μg) Extrait au Triton (40 μg)
- *S.pombe* : PSM (60 μg) Extrait au Triton (40 μg)
- Foie de rat : PSM (40 μg) Extrait au Triton (28 μg).

.../...

(Suite de la légende de la figure 19).

Les mitochondries de foie de rat (Sprague-Dawley) ont été isolées par centrifugation différentielle (42 - 43), et soniquées en présence de 0,25 M saccharose, 10 mM Tris-acétate pH 7,5, pendant 1 mn à température ambiante, puis centrifugées à 100 000 g pendant 30 mn. Le culot est remis en suspension dans le "milieu d'extraction".

L'extraction au Triton est réalisée selon les conditions de matériel et méthode.

Organismes	Milieu de culture	Inhibition maximale par l'oligomycine	Effets du DCCD
F1 - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ - <u>S.pombe</u> M 126	Glycérol Glucose Glucose	< 5 % < 5 % < 5 %	Pas d'effet ou légère inhibition
Extrait Triton chauffé <u>S.pombe</u> PSM <u>S.pombe</u> M 126	Glycérol Glucose	< 5 % < 5 %	
Extrait Triton: - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ - Foie de rat PSM: - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻ PSM chauffées - <u>S.pombe</u> 972 h ⁻	Glycérol Glucose Glycérol Glucose Glycérol	55 % 57 % 80 % 65 % 65 % 58 %	inhibition + stimulation plus ou moins prononcée
Extrait Triton: - <u>S.cerevisiae</u> PSM - <u>S.cerevisiae</u> - Foie de rat	Ethanol Ethanol	92 % 93 % 94 %	large inhibition + stimulation nulle ou faible

Tableau 14 :

Corrélation entre le taux maximum d'inhibition par l'oligomycine (80 µg par essais) et les effets du DCCD sur l'activité de l'ATPase mitochondriale.

Les conditions sont décrites dans les figures correspondant à chaque cas.

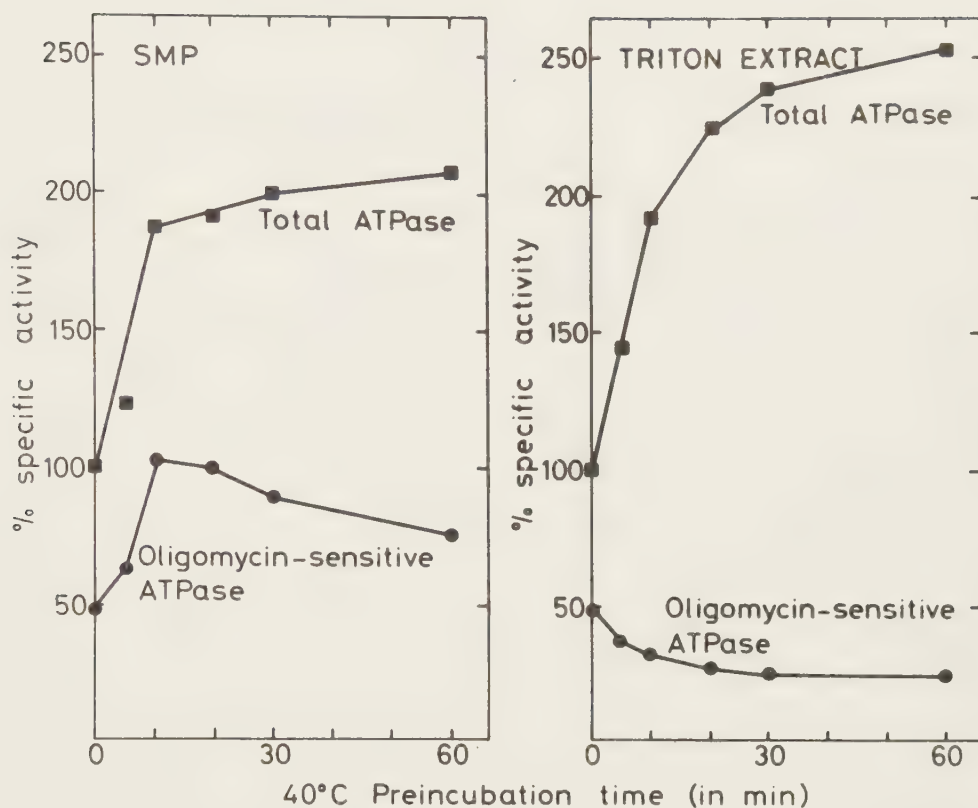


Figure 20 :

Effets de la chaleur sur l'activité ATPasique des particules submitochondriales et de l'extrait au Triton de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol. Conditions: Les échantillons sont incubés à 40°C pendant les temps indiqués. Les activités ATPasiques sont mesurées immédiatement en absence (ATPase totale) ou en présence d'oligomycine (l'ATPase "sensible à l'oligomycine" est obtenue par différence entre ces deux mesures). Les activités sont exprimées en % par rapport aux échantillons non incubés (activité ATPasique spécifique PSM = 5, Extrait au Triton = 6).

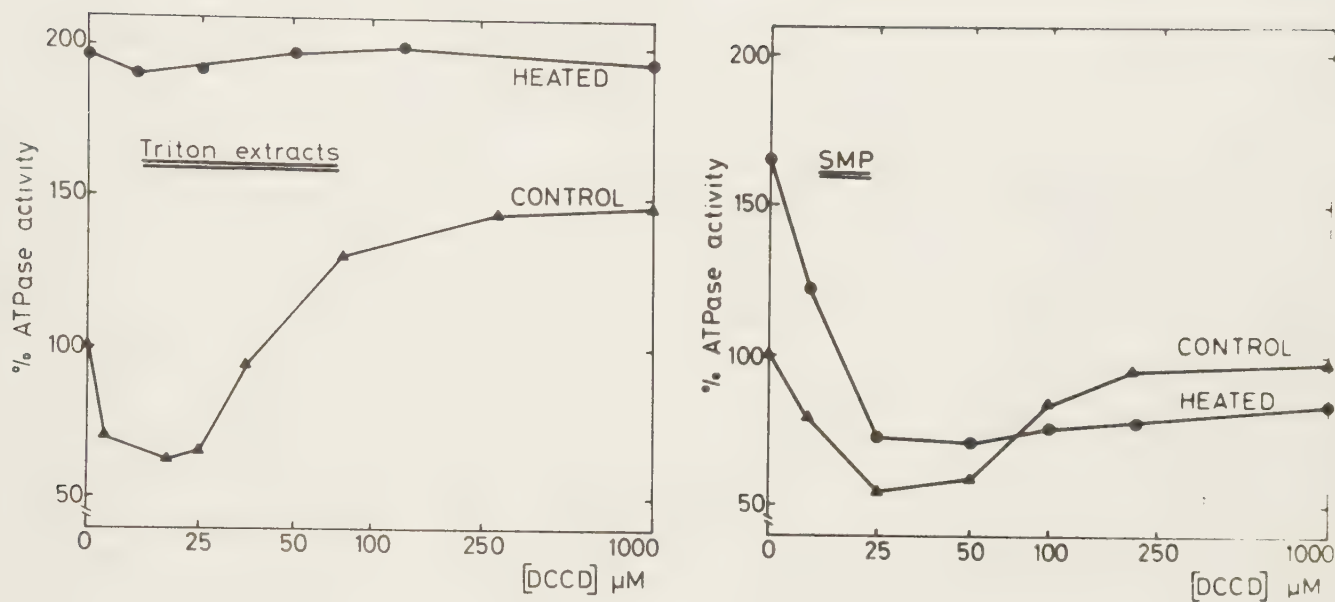


Figure 21:

Effets du DCCD sur l'activité ATPasique de particules submitochondriales et d'extraits au Triton (*S. pombe*-glycérol) préincubés ("heated") ou non ("control") pendant 20 mn à 40°C.

Conditions:

Identiques à celles de la figure 16.

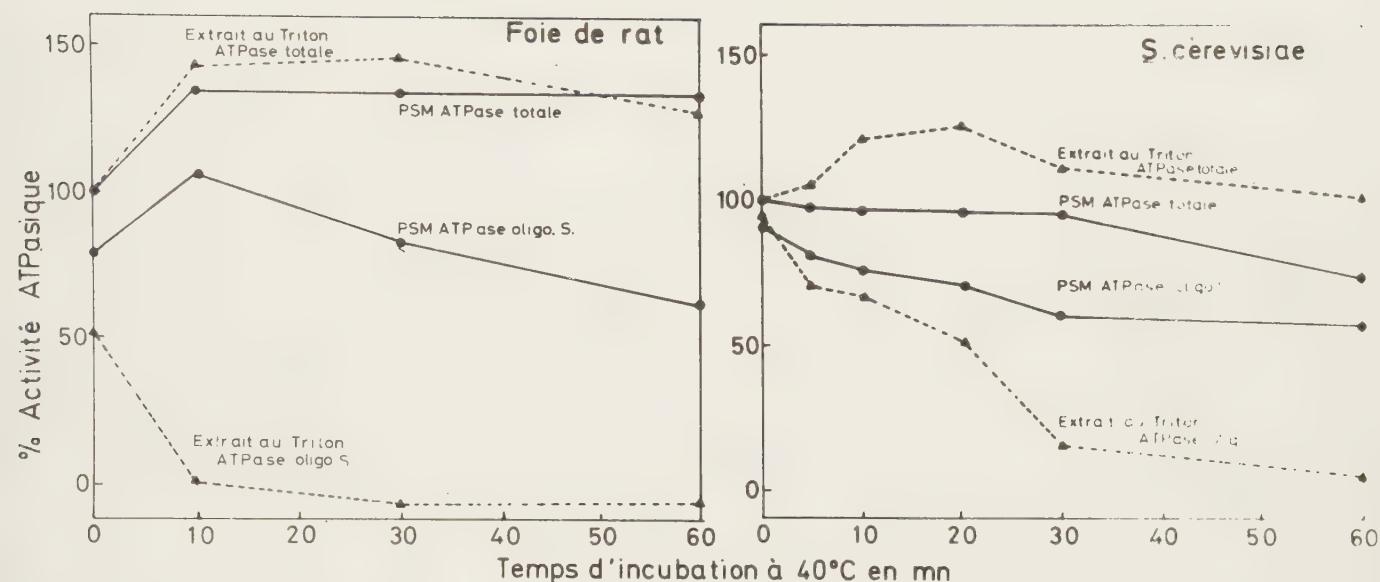


Figure 22 :

Effets de la chaleur sur l'activité ATPasique des particules submitochondriales et de l'extrait au Triton de foie de rat et de S.cerevisiae cultivée en milieu éthanol.

Conditions:

Identiques à la figure 20.

Activités spécifiques des échantillons non incubés:

S.cerevisiae PSM = 2,5

Extrait au Triton = 2,8

Foie de rat PSM = 2,8

Extrait au Triton = 1,3.

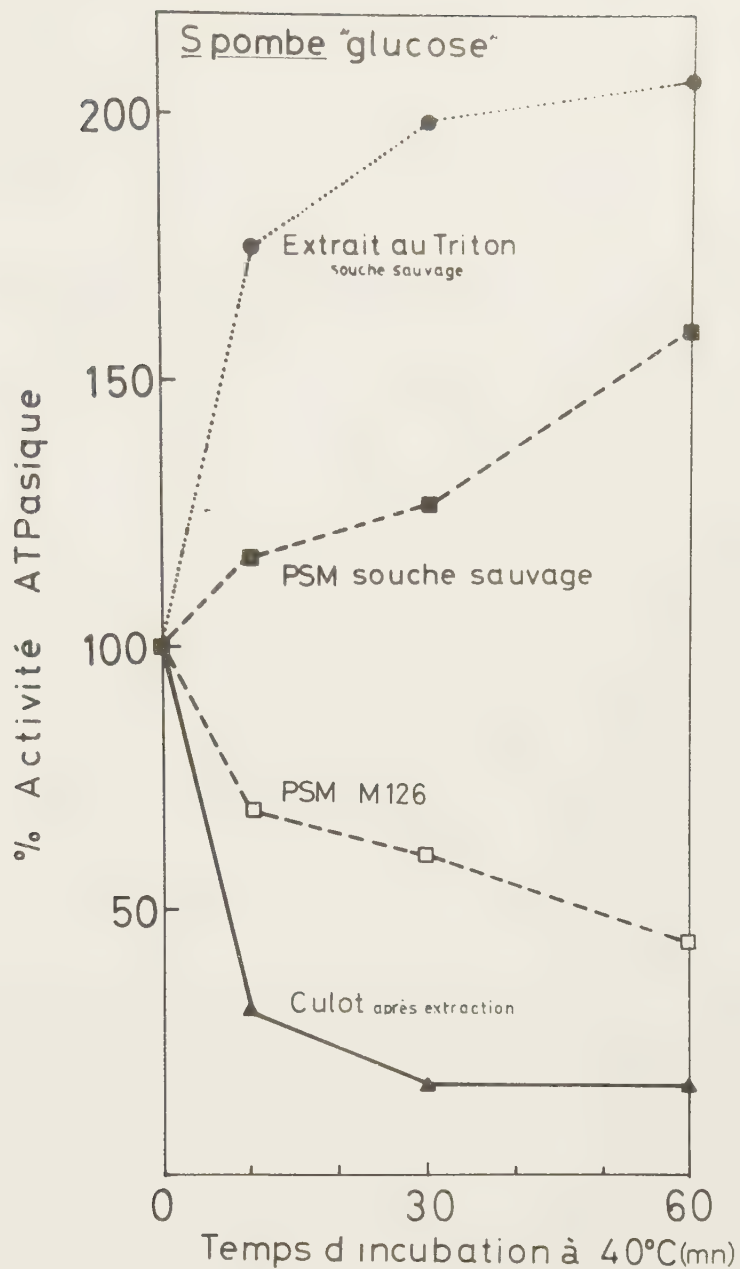


Figure 23 :

Effets de la chaleur sur l'activité ATPasique de S.pombe cultivée en milieu glucose: particules submitochondriales de la souche sauvage et du mutant M 126, extrait au Triton de la souche sauvage, et culot membranaire recueilli après l'extraction des PSM par le Triton X-100.

Conditions identiques à la figure 20.

Activités spécifiques des échantillons non incubés:

- PSM souche sauvage: 3,8
- mutant M 126 : 1,3
- Extrait au Triton: 2,8
- Culot après extraction : 3,9.

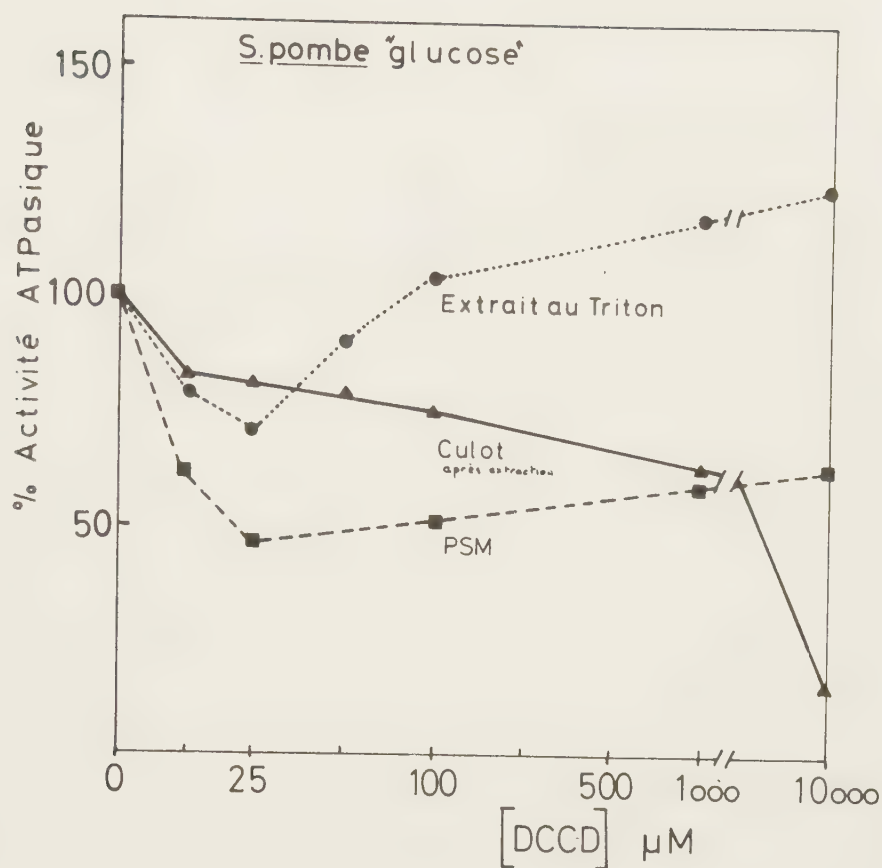


Figure 24 :

Effets du DCCD sur l'activité ATPasique des particules submitochondriales, de l'extrait au Triton et du culot recueilli après cette extraction, de *S.pombe* cultivée en milieu glucose.

Conditions:

Identiques à la figure 23.

Activités Spécifiques	Traitement au sulfate d'ammonium	
	Avant	Après
ATPase totale	5,5	7,5
ATPase oligo.S.	3,7	5,5

Tableau 15 :

Effet du traitement au sulfate d'ammonium de l'extrait
au Triton X-100 de S. pombe cultivé en milieu glycérol.
Conditions: voir "matériel et méthodes".

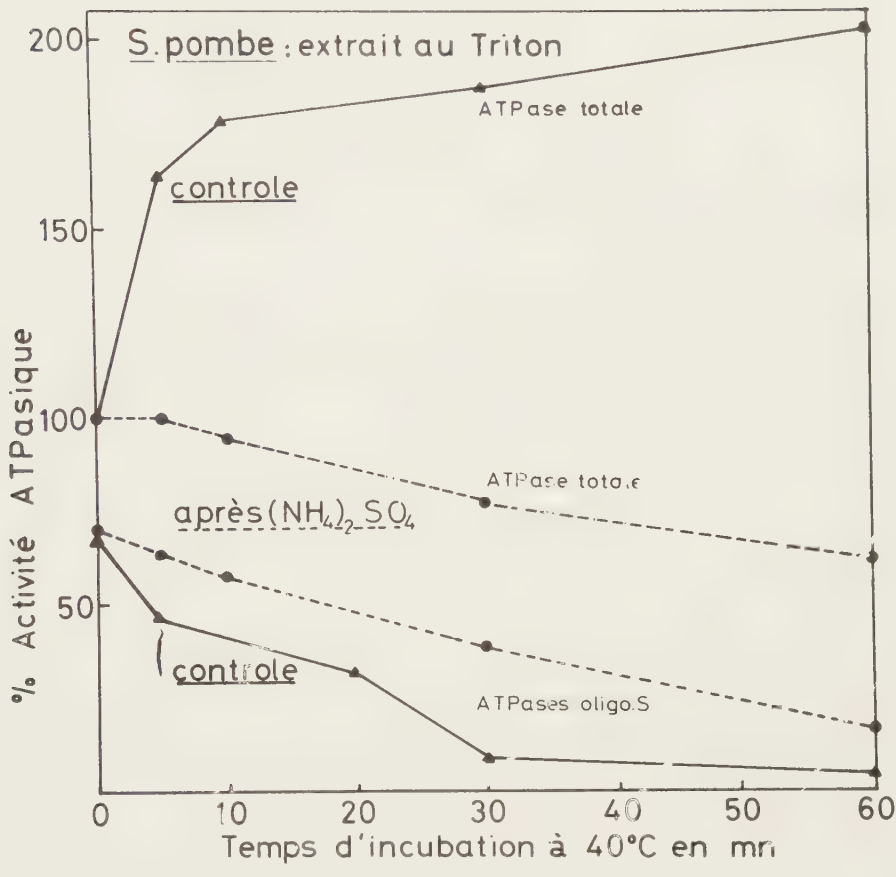


Figure 25 :

Effets de la chaleur sur l'extrait au Triton de S.pombe cultivée en milieu glycérol. L'extrait au Triton est traité au sulfate d'ammonium selon les conditions de "matériel et méthodes". L'extrait de contrôle ne subit pas ce traitement. Les activités ATPasiques sont exprimées en % par rapport à l'activité spécifique ATPasique totale du contrôle non incubé (activité spécifique 5,5) et de l'extrait traité au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (activité spécifique 7,5).

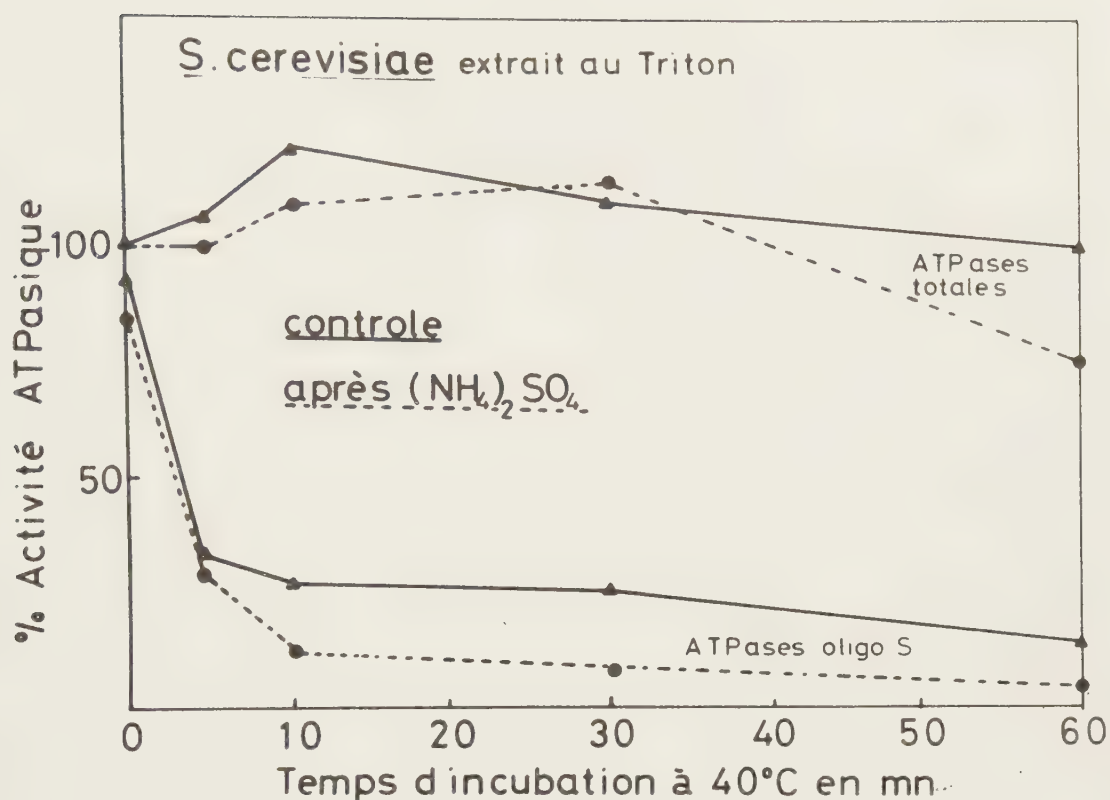


Figure 26 :

Effets de la chaleur sur l'extrait au Triton de S.cerevisiae cultivée en milieu éthanol.

Conditions identiques à la figure 25.

Activité spécifique de l'extrait au Triton non traité au sulfate d'ammonium = 2,8. L'activité spécifique de l'extrait traité au sulfate d'ammonium n'a pas été déterminée.

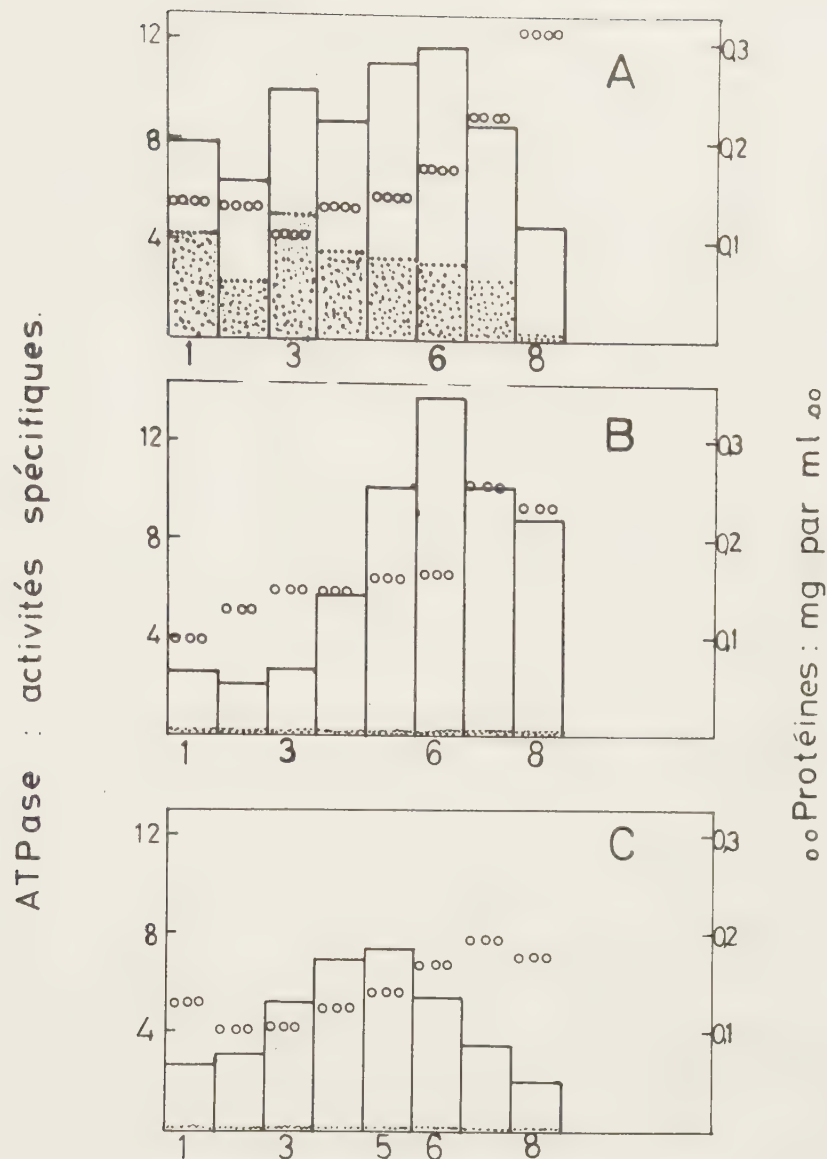


Figure 27 :

Centrifugation en gradient de densité d'extrait au Triton de S.pombe cultivé en milieu glycérol.

A: Extrait au Triton, activité spécifique totale 3,7 et activité ATPasique sensible à l'oligomycine 1,88.

B: Extrait au Triton préincubé à 40°C pendant 35 mn. Activité spécifique ATPasique totale: 5,6 et activité ATPasique sensible à l'oligomycine 0,4.

C: Extrait au Triton prétraité par 40 n moles de DCCD par mg de protéines

.../...

(Suite de la légende de la figure 27).

C: Extrait au Triton prétraité par 40n moles de DCCD par mg de protéines. Le DCCD non soluble est éliminé avant le passage sur gradient
Activité spécifique ATPasique 1,8 et activité spécifique ATPasique sensible à l'oligomycine 0,1.

Les extraits au Triton ainsi préparés sont déposés sur des gradients linéaires de saccharose 10 à 25 %

35 mM Tris CH_3COOH pH 8,3, 2 mM ATP, 1 mM EDTA , de 12 ml (rotor 60 centrifugeuse³ Christ Omega II) et centrifugés pendant 3 heures à 150 000 g et à 20°C.

Les gradients sont divisés en fractions de 1,1 ml numérotées à partir du fond des tubes. Les activités ATPasiques des huit premières fractions de chaque gradient et des aliquotes des échantillons de départ sont alors mesurées.

Les résultats sont reproduits sur les graphiques:

- Traits pleins: activité spécifique de l'ATPase totale (mesurée en absence d'inhibiteurs).
- Pointillés: activité spécifique de l'ATPase sensible à l'oligomycine (80 μg par ml d'essai).
- Cercles: mg de protéines par ml de fractions.

PSM	% Protéines dans le surnageant	% ATPase dans le surnageant
- controle	9%	3,6%
- préincubées 20mn à 40°C	15%	8,1%
- + DCCD	9%	-

Tableau 16:

Libération de protéines et d'activité ATPasique par action de la chaleur et du DCCD sur des PSM de S.pombe cultivé en milieu glycérol.

Conditions:

Controle: des PSM fraîchement préparées sont mises en suspension (10mg/ml) dans le "milieu d'extraction" et centrifugées 30mn à 120 000g. Le surnageant est chauffé pendant 20mn à 40°C. La concentration de protéines et les activités ATPasiques de ce surnageant sont mesurées et exprimées en % des PSM de départ.

PSM préincubées: les PSM sont incubées 20mn à 40°C.

Après centrifugation, le surnageant est dosé comme ci-dessus.

PSM + DCCD: les PSM sont incubées pendant 8mn à 80 µmoles de DCCD par ml, puis centrifugées. Les protéines du surnageant sont mesurées.

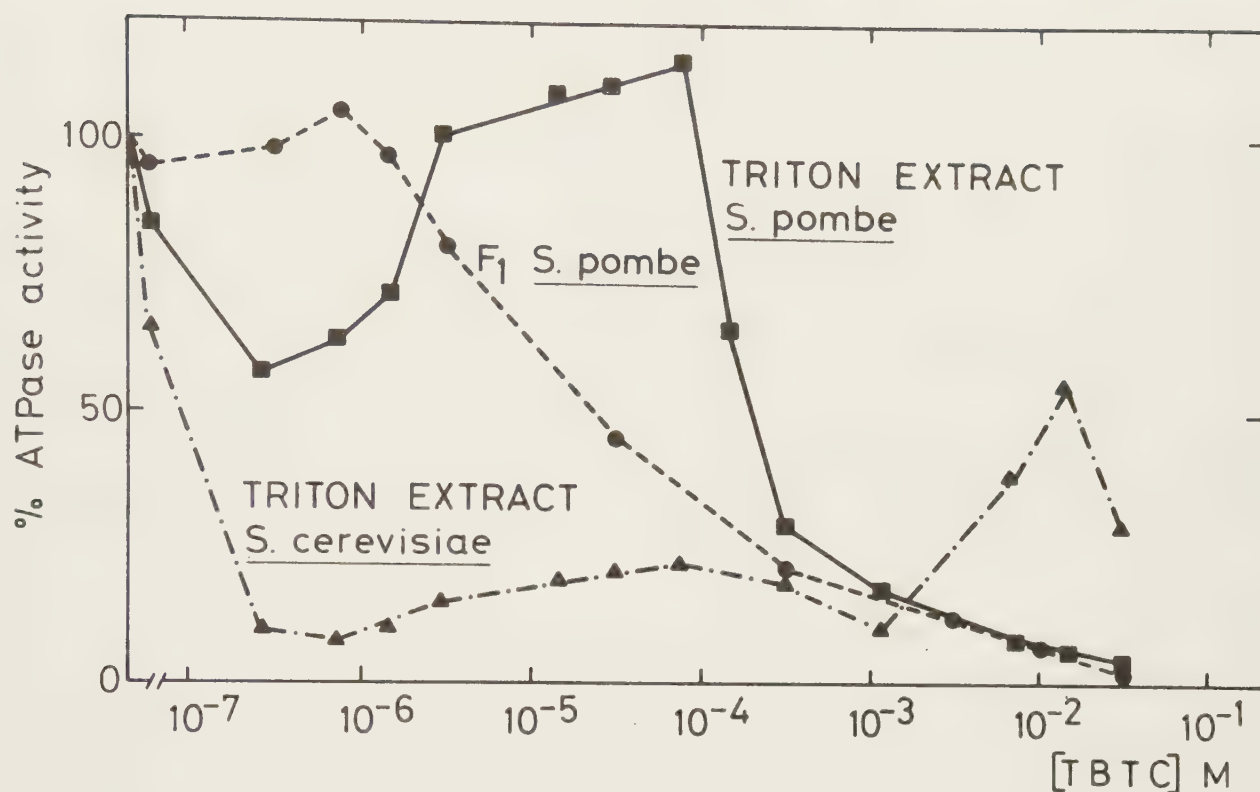


Figure 28 :

Effets du chlorure d'étain tributylé (TBTC) sur l'activité ATPasique du facteur F_1 et de l'extrait au Triton de *S.pombe* cultivée en milieu glycérol et sur l'activité ATPasique de l'extrait au Triton de *S.cerevisiae* cultivée en milieu éthanol.

Conditions:

Quantités de protéines par ml de milieu de dosage de l'activité ATPasique:

- *S.pombe* : F_1 1 μ g (activité spécifique 60)
Extrait au Triton 15 μ g (activité spécifique 6)
- *S.cerevisiae*:
Extrait au Triton 40 μ g (activité spécifique 3).

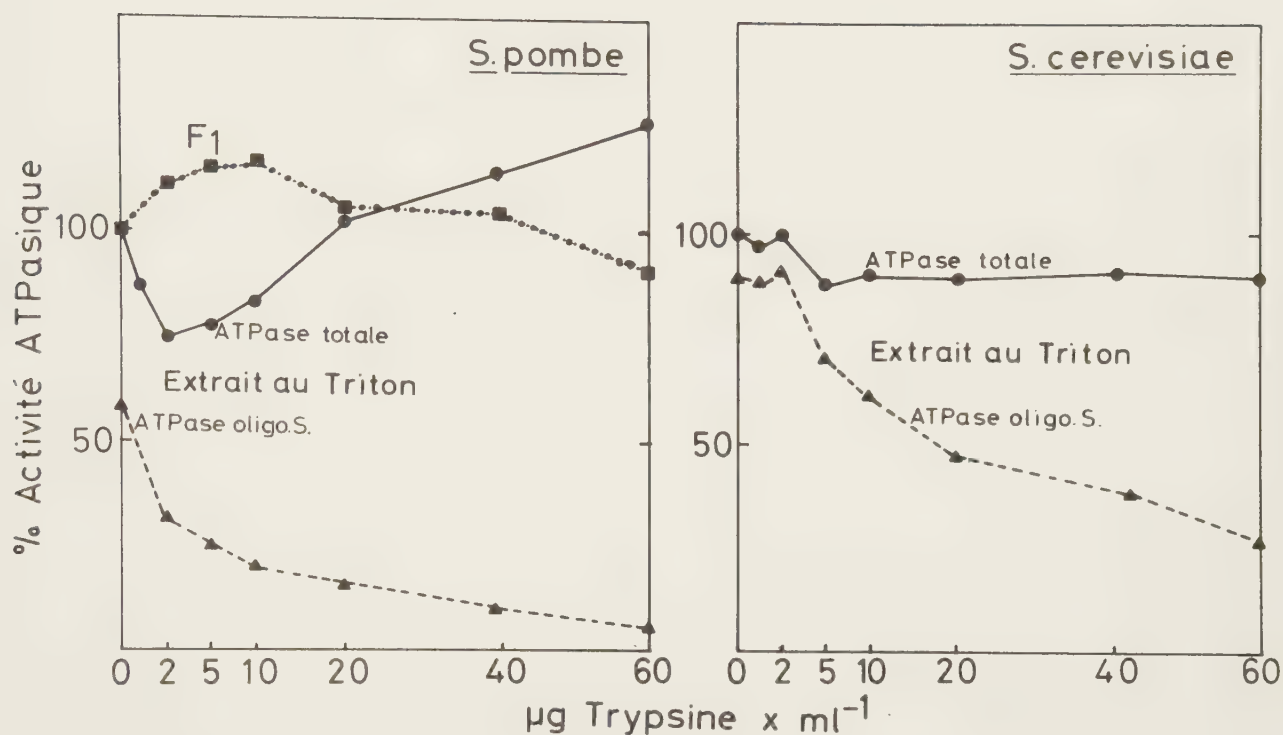


Figure 29 :

Effets de la trypsine sur l'activité ATPasique de l'extrait au Triton de *S. pombe* cultivée sur glycérol, et du facteur F₁, et sur l'activité ATPasique de l'extrait au Triton de *S. cerevisiae*.

1 ml d'échantillon est mis en présence de 0 à 60 µg de trypsine.

Après 10 mn l'action de la trypsine est arrêtée par l'adjonction de 80 µg d'inhibiteur de la trypsine extrait du soja.

Les mesures d'activités sont effectuées immédiatement.

Echantillons: F₁: 0,2 mg de protéines par ml (activité spécifique 82)

Extrait au Triton: *S. pombe*: 1,2 mg protéines/ml

(activité spécifique 5,5)

S. cerevisiae: 1,9 mg protéines/ml

(activité spécifique 2,8).

Extrait au Triton		Mesures immédiates		Mesures après 30mn à 40°C		Mesures après 30mn à +2°C	
		ATPase Totale	ATPase oligo.S	ATPase Totale	ATPase oligo.S	ATPase Totale	ATPase oligo.S
Témoins	:	100	70	197	0	95	67
+ inhibiteur	:						
+ trypsine	:	93	58	190	14	—	—
+ trypsine	:						
+ inhibiteur	:	162	20	162	16	89	15

Tableau 17 :

Effet de la trypsine à haute concentration sur l'extrait au Triton de S.pombe cultivée en milieu glycérol.

Conditions:

Les PSM sont soumises à l'effet du TRiton X-100 dans les conditions décrites dans "matériel et méthodes": le surnageant obtenu est "l'extrait au Triton".

Témoins: l'activité ATPasique de cet extrait est mesurée immédiatement et après 30mn d'incubation à 40°C ou à + 2°C.

Traitement à la trypsine: 60 µg de trypsine sont ajoutés à 1 ml d'extrait au Triton (2mg de protéines par ml). L'action de la trypsine est arrêtée après 10mn en ajoutant 80 µg d'inhibiteur de la trypsine. Un témoin d'action de la trypsine est effectué en ajoutant l'inhibiteur avant la trypsine. Les activités ATPasiques sont mesurées immédiatement après ces traitements et après 30mn d'incubation à 40°C et +2°C.

Ces activités sont rapportées à 100 = Activité ATPasique totale du témoin.

Etapes de purification	<u>S.pombe</u> (glycérol)	<u>S.pombe</u> (glucose)	M.126 (glucose)
	Activités Spécifiques		
Homogénat	0,8	0,4	0,2
PSM	5,8	2,1	0,6
Surnageant ph 5,6	14	4,1	2,0
Surnageant 40% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	17	6,6	3,2
Culot 80% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	33	8,3	7,1
Eluat Sephadex	29	5,2	6,8
Eluat DEAE	54	24	14
Gradient glycérol	102	42	80

Tableau 18 :

Comparaison de la purification de l'ATPase mitochondriale (facteur F_1) chez Schizosaccharomyces pombe cultivée en milieu glycérol et milieu glucose et chez le mutant M.126.

Ce tableau est renroduit avec l'autorisation de A. Goffeau (27).

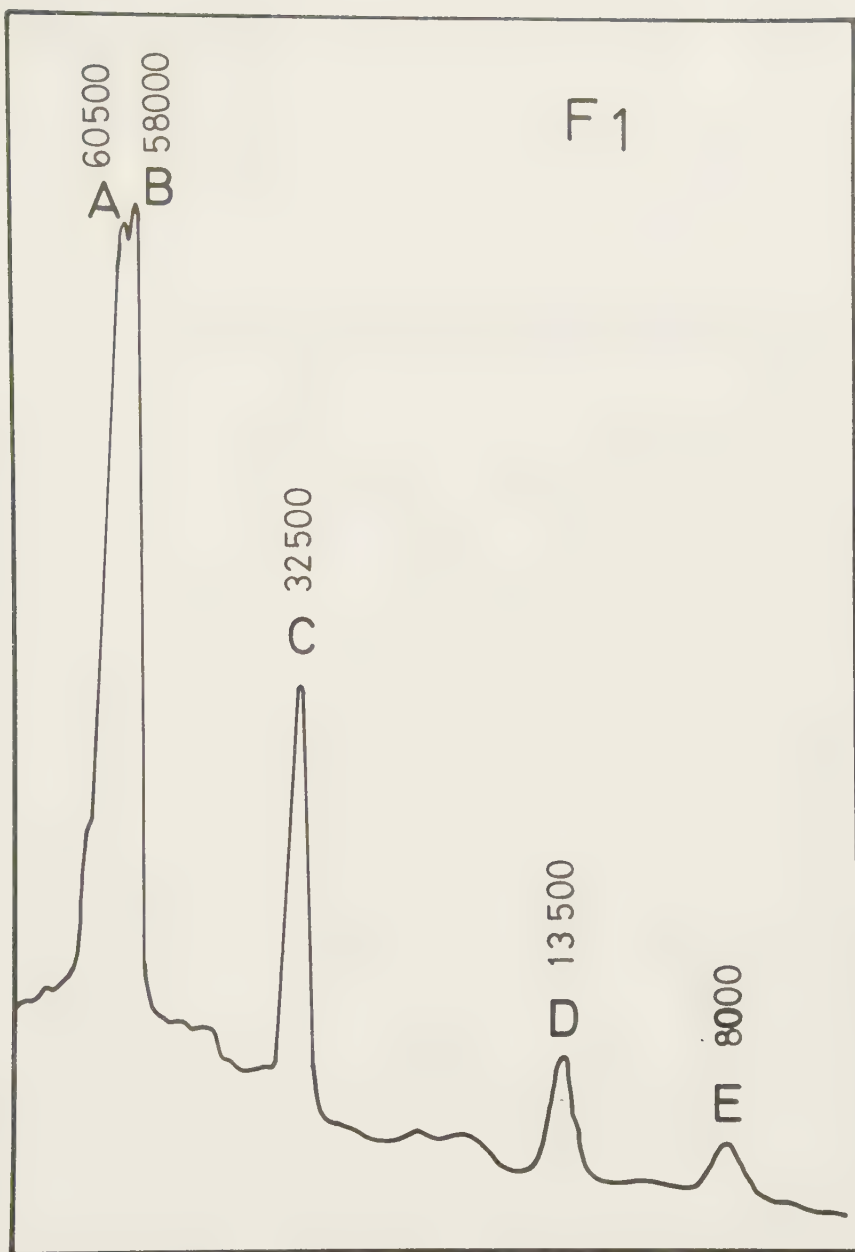


Figure 30 :
 Séparation des sous unités de l'ATPase mitochondriale (facteur F₁) de *S.pombe*
 cultivée en milieu glycérol, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.
 Dépôt: 5 µg de protéine.
 Activité spécifique 102.
 Conditions:
 Voir "matériel et méthodes".

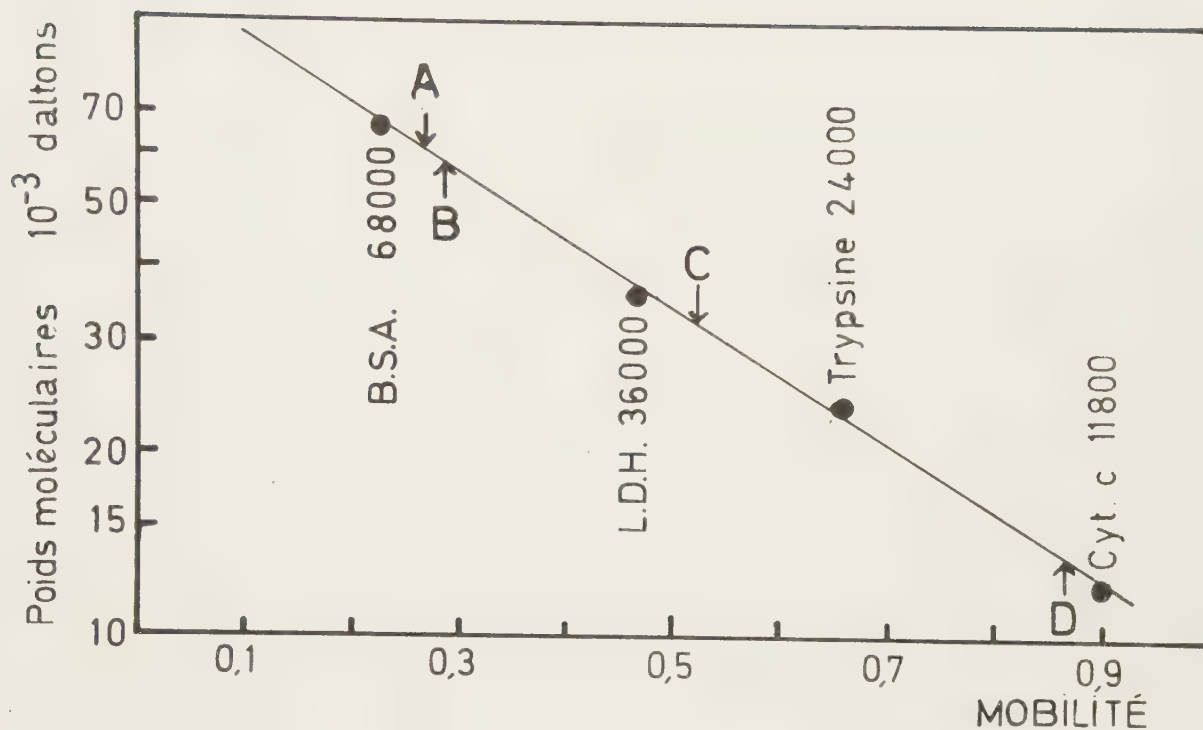


Figure 31 :

Courbe étalon pour l'estimation du poids moléculaire des sous unités protéiques en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Les points A, B, C, D, correspondent aux quatre premières sous unités du facteur F₁. (BSA = Albumine de sérum bovin, LDH = deshydrogénase lactique-) Représentation selon Weber et Osborn (94).

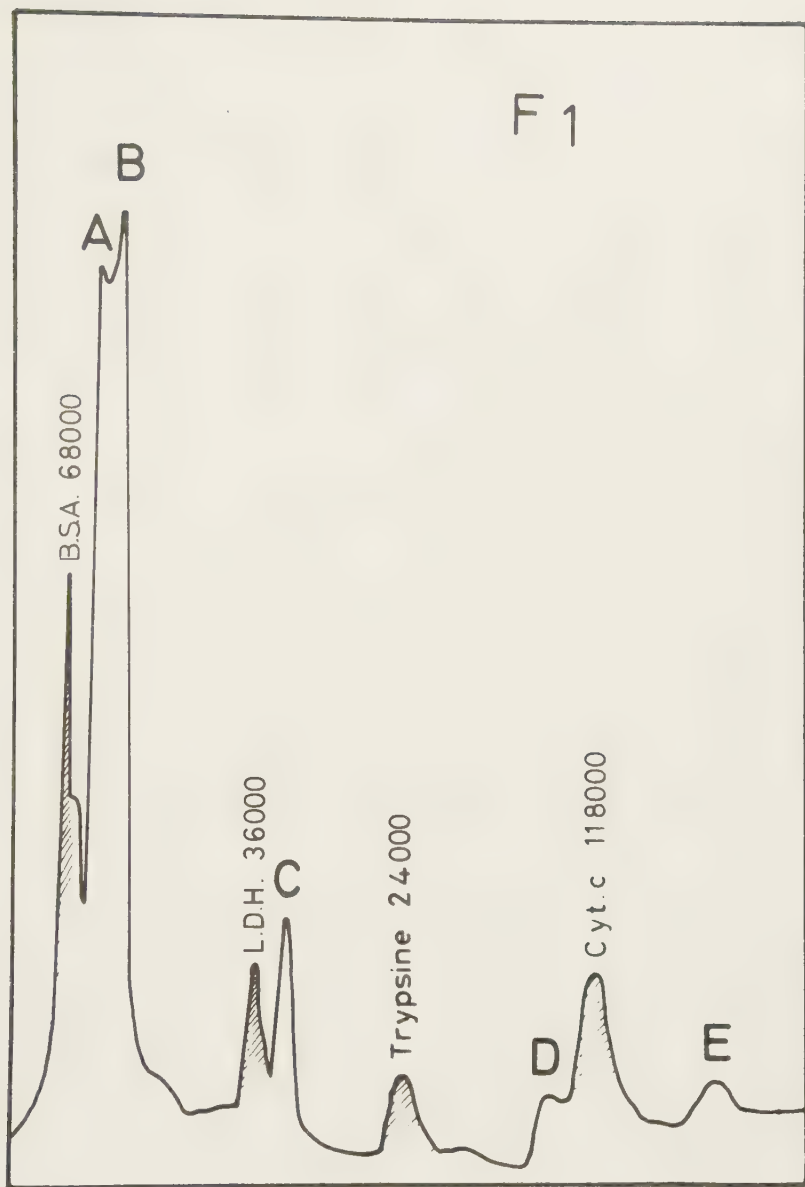


Figure 32 :

Co-migration du facteur F_1 et de quatre protéines témoins sur gel de polyacrylamide.

Conditions:

Identiques à celles de la figure 30.

Références	Tzagoloff et al (87)	Lambeth et al (41)	Catterall et al (45)	Senior et al (68)	Senior et al (69)	Knowles et al (39)
Matériel	<u>S.pombe</u>	<u>S.cerevisiae</u>	Foie de rat	Foie de rat	Coeur de boeuf	Coeur de boeuf
Conditions	Acry.10%	Acry.10%	Acry.5%	Acry.10%	Acry.10%	Acry.10% Gel Filtration
Sous unités						
A	60 500	58 500	-	62 500	53 000	59 500 53 200
B	58 000	54 000 38 500	53 000	57 000	50 000	54 000 50 800
C	32 000	31 000	28 000	36 000	25 000	33 000 33 000
D	13 500	12 000	12 500	-	12 500	13 600 17 300
E	7 500	-	8 500	-	7 500	- 5 700

Tableau 19:
 Comparaison des poids moléculaires des sous unités de γ ATPase (facteur F_1) isolées à partir de
 diverses espèces.



Figure 33 :

Mise en évidence des impuretés présentes dans la préparation de facteur F_1 .

Conditions:

Identiques à celles de la figure 30.

Dépot: 20 μ g de protéines.

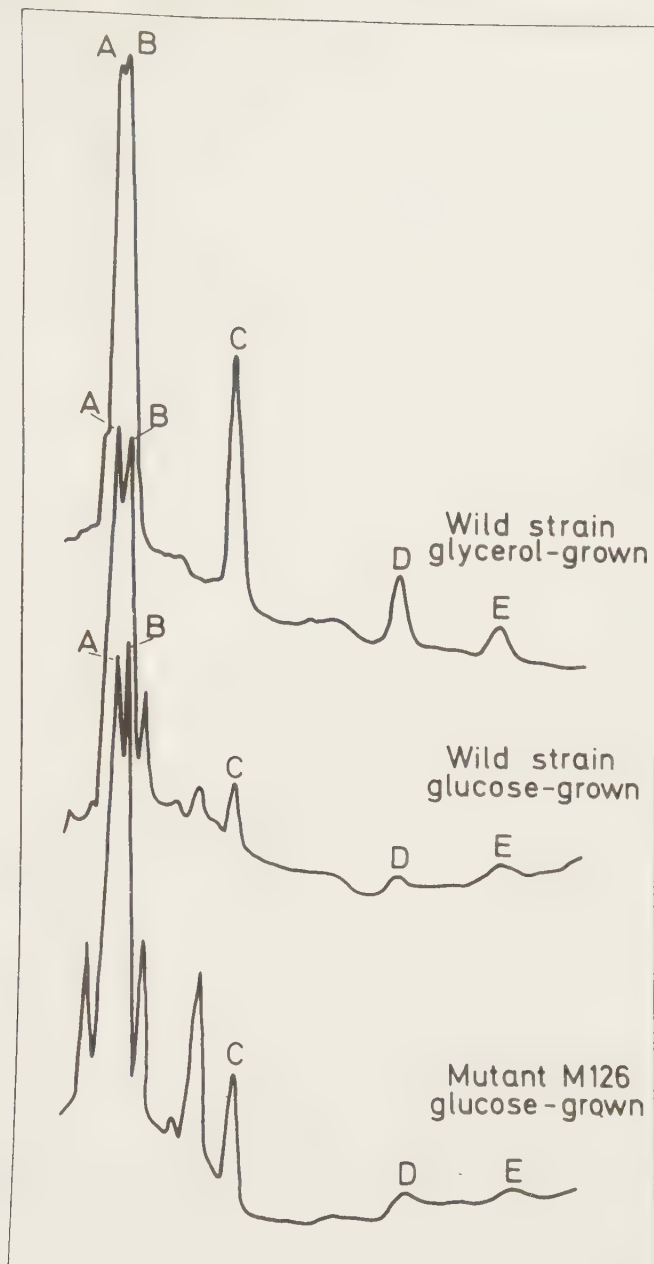


Figure 34 :
 Séparation électrophorétique des sous unités du facteur F_1 de S.pombe
 cultivée en milieu glycérol et milieu glucose ("Wild strain") et du
 mutant M 126.
 Dépôts: 5 μ g de protéines
 Activités spécifiques: voir tableau 18.

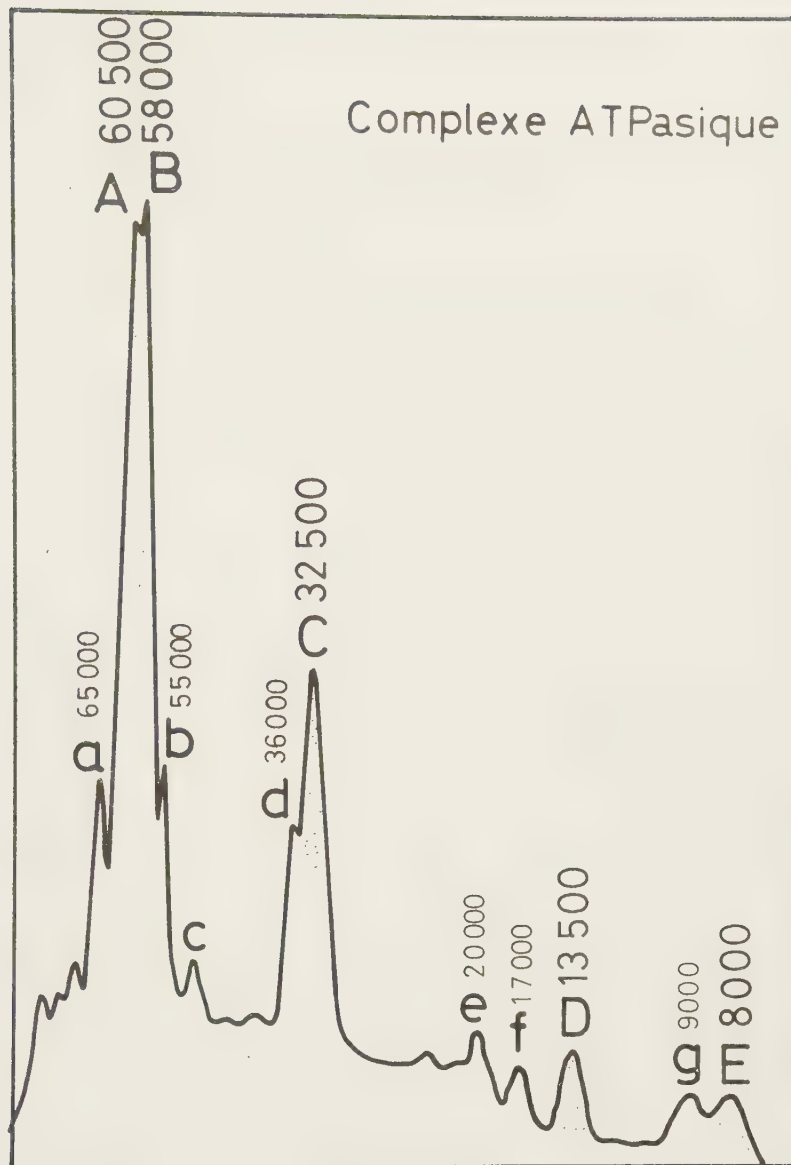


Figure 35 .:

Séparation électrophorétique des sous unités du complexe ATPasique sensible à l'oligomycine isolé à partir de S.pombe cultivée sur glycérol.

Dépot: Protéines 10 µg.

Activités spécifiques: ATPase totale: 30

ATPase oligo. S. : 16.

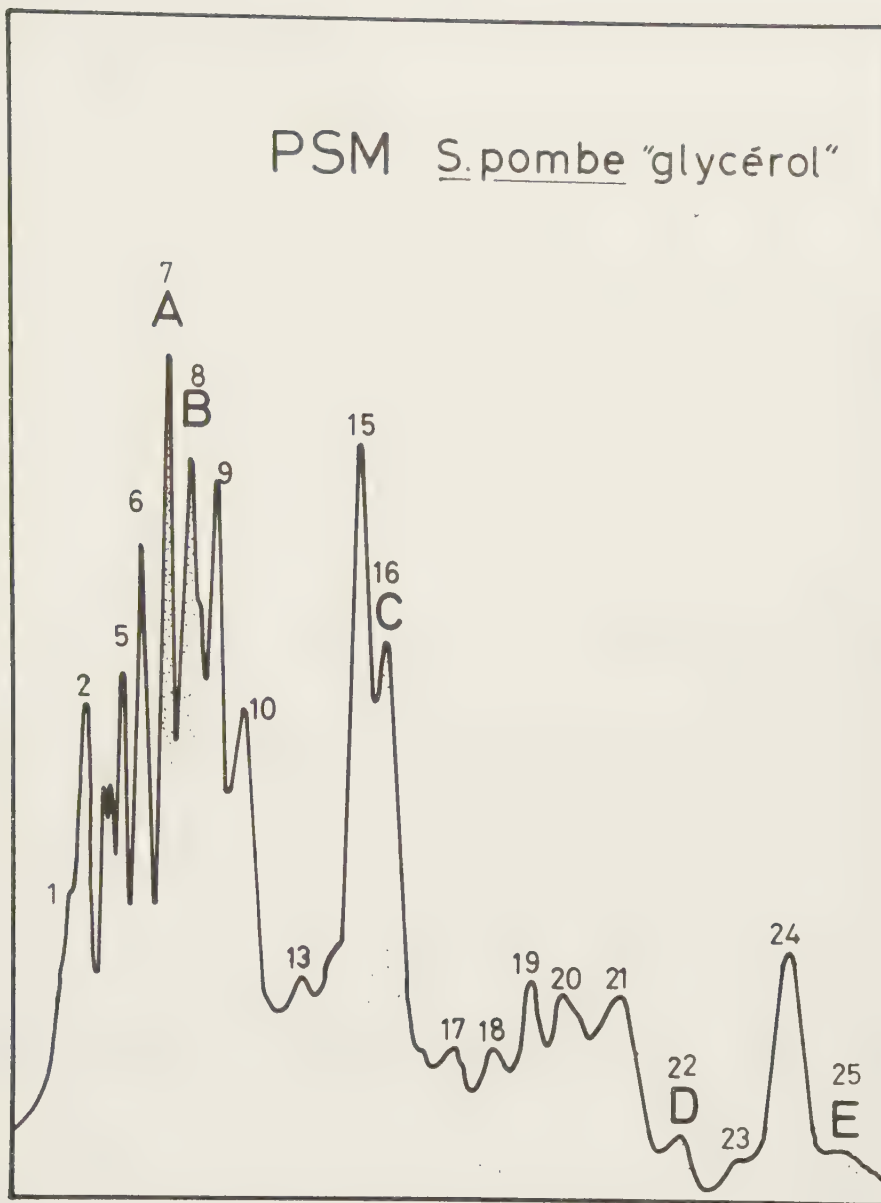


Figure 36 :
 Profil électrophorétique des sous unités des PSM de S. pombe cultivée en milieu glycérol sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.
 A, B, C, D, E, correspondant aux sous unités du facteur F_1 .
 Dépot : 25 μ g de protéines PSM.

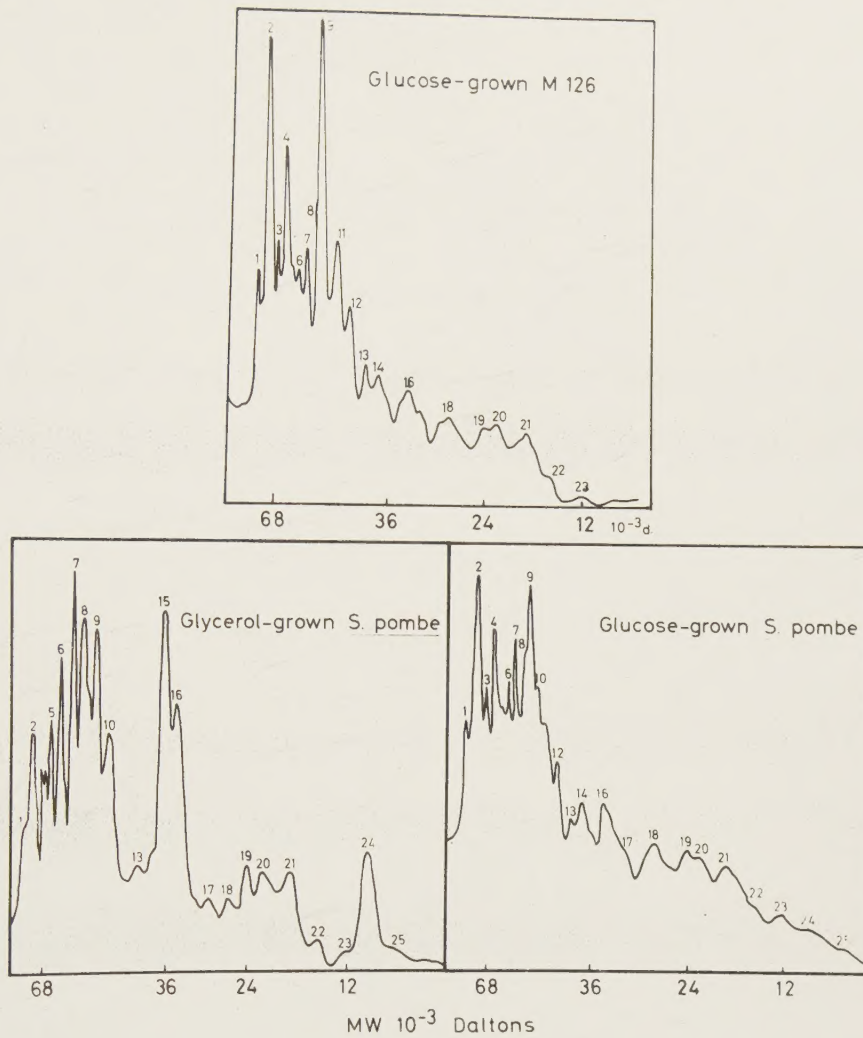


Figure 37 :
 Profils électrophorétiques des sous unités des PSM de *S. pombe* cultivée en milieu glucose et milieu glycérol, et du mutant M 126.

Conditions identiques à la figure 36.

